



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6		A1	(11) 国際公開番号	WO96/09320
C07K 14/295, C12N 15/31, 1/21, C12P 21/02, 21/08, C12Q 1/68, G01N 33/569			(43) 国際公開日	1996年3月28日(28.03.96)
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日		PCT/JP95/01896 1995年9月20日(20.09.95)		
(30) 優先権データ		松本 明(MATSUMOTO, Akira)[JP/JP] 〒701-01 岡山県倉敷市庄新町8番2-4号 Okayama, (JP) (74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目7番7号 虎ノ門中田ビル2F Tokyo, (JP)		
特願平6/224711 1994年9月20日(20.09.94) JP 特願平7/106006 1995年4月28日(28.04.95) JP 特願平7/106008 1995年4月28日(28.04.95) JP 特願平7/106009 1995年4月28日(28.04.95) JP 特願平7/106010 1995年4月28日(28.04.95) JP 特願平7/106011 1995年4月28日(28.04.95) JP		(81) 指定国 AU, CN, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).		
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日立化成工業株式会社 (HITACHI CHEMICAL COMPANY, LTD.)(JP/JP) 〒163-04 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 Tokyo, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に、規則13の2に基づいて提出された微生物の寄託に関する表示 国際事務局による受理の日付: 1995年10月9日(09.10.95)		
(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 井筒 浩(IZUTSU, Hiroshi)(JP/JP) 〒300-32 茨城県つくば市前野1596-10 Ibaraki, (JP) 小原和彦(OBARA, Kazuhiko)(JP/JP) 〒300-32 茨城県つくば市花畑一丁目15-18 日立化成 茨城寮 Ibaraki, (JP)				

(54) Title: ANTIGENIC POLYPEPTIDE OF CHLAMYDIA PNEUMONIAE

(54) 発明の名称 クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチド

(57) Abstract

An antigenic polypeptide of *Chlamydia pneumoniae* comprising the polypeptide A containing the sequence of at least five consecutive amino acid residues in the polypeptide of SEQ ID NO: 1; a DNA coding for the polypeptide; a recombinant vector containing the DNA; a transformant containing the vector; a process for producing an anti-*C. pneumoniae* antibody by using the antigenic polypeptide as the antigen; methods for detecting and assaying the anti-*C. pneumoniae* antibody; the use of the antigenic polypeptide; a fused protein consisting of a dihydrofolate reductase and an antigenic polypeptide *C. pneumoniae*, wherein the polypeptide of SEQ ID NO: 14 has bound to the polypeptide A containing the sequence of at least five consecutive amino acid residues in the polypeptide of SEQ ID NO: 1; a DNA coding for the fused protein; a recombinant vector containing the DNA; a transformant containing the vector; a process for producing an anti-*C. pneumoniae* antibody by using the fused protein as the antigen; methods for detecting and assaying the anti-*C. pneumoniae* antibody by using the fused protein as the antigen; the use of the fused protein; a probe and a primer for detecting and assaying *C. pneumoniae* genes; methods for detecting and assaying *C. pneumoniae* genes by using the probe or primer; and the use of the probe or primer.

(57) 要約

配列 号1のポリペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸配列を含むポリペプチドAからなる、クラミジア・ニューモニエ（以下「C. ニューモニエ」という）の抗原ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該抗原ポリペプチドを抗原として用いることを特徴とする抗C. ニューモニエ抗体の製造方法、抗C. ニューモニエ抗体の検出・測定方法及び該抗原ポリペプチドの用途、並びに配列番号14のポリペプチドに、配列番号1のポリペプチドの中の少なくとも5個のアミノ酸配列を含むポリペプチドAが結合した、ジヒドロ葉酸還元酵素－C. ニューモニエの抗原ポリペプチド融合タンパク質、該融合タンパク質をコードするDNA、該DNAを含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該融合タンパク質を抗原として用いることを特徴とする抗C. ニューモニエ抗体の製造方法、該融合タンパク質を抗原として用いることを特徴とする抗C. ニューモニエ抗体の検出・測定方法、該融合タンパク質の用途、C. ニューモニエ遺伝子の検出・測定用プローブ及びプライマー、該プローブ又はプライマーを用いるC. ニューモニエ遺伝子の検出・測定方法及び該プローブ又はプライマーの用途。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	DE	ドイツ	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AT	オーストリア	ES	スペイン	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BB	バルバドス	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BE	ベルギー	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TD	チャド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー		スラヴィア共和国	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モリタニア	TR	トルコ
CG	コンゴ	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン				

明 細

クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチド、それを含む融合タンパク質、そのDNA、そのDNAを含む組換えベクター、その組換えベクターを含む形質転換体、抗体の製造方法、抗体の検出・測定方法及び試薬、クラミジア・ニューモニエ感染の診断方法及び診断薬、クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用プローブ及びプライマー並びにクラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定方法及び試薬

技術分野

本発明は、クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチド、それを含む融合タンパク質、そのDNA、そのDNAを含む組換えベクター、その組換えベクターを含む形質転換体、抗体の製造方法、抗体の検出・測定方法及び試薬、クラミジア・ニューモニエ感染の診断方法及び診断薬、クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用プローブ及びプライマー並びにクラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定方法及び試薬に関する。本発明は、医薬品工業、特にクラミジア・ニューモニエ感染症の診断薬の製造において有効に利用される。

背景技術

クラミジア属の細菌は、クラミジア・トラコマチス(*Chlamydia trachomatis*)、クラミジア・シッタシ(*Chlamydia psittaci*)、クラミジア・ペコラム(*Chlamydia pecorum*)、クラミジア・ニューモニエ(*Chlamydia pneumoniae*)等の種 (Species) が知られている。クラミジア・トラコマチスは、トラコーマ、性病性リンパ肉芽腫、泌尿生殖器感染症、封入体結膜炎、新生児肺炎等を引き起こす原因菌であり、クラミジア・シッタシは、オウム病等の原因菌であり、またクラミジア・ニューモニエは、呼吸器感染症、異形肺炎等の原因菌である。

クラミジア・ニューモニエの引き起こす呼吸器感染症の症状は、マイコプラズマ・ニューモニエやインフルエンザウイルスが原因で起こる感染症の症状と類似しているので、しばしば誤診されやすい。そのため、クラミジア・ニューモニエの簡便な診断方法の開発が望まれていた。

感染症の診断は、通常、感染部位等における原因菌の存在の検出か、血清・その他の体液中における（原因菌に対する）抗体の存在の検出により確定的になされる。前者は抗原検査、後者は抗体検査と呼ばれ、いずれも臨床で重要な意義があり、クラミジア・ニューモニエの抗体検査としては、クラミジア・ニューモニエの基本小体を用いて抗体の存在を検出する方法が知られている。

しかし、クラミジア・ニューモニエの基本小体は、クラミジア・ニューモニエ以外のクラミジア属細菌、すなわち、クラミジア・トラコマチス又はクラミジア・シッタシにも共通に存在する抗原を含むため、この基本小体を抗原として用いる方法では特異性に欠ける難点があった。

一方、大腸菌においてタンパク質を大量に発現させることのできるプラスミドとして、pBBK10MMが知られている（特開平4-117284号公報）。このプラスミドは、DHFRと抗アレルギー性ペプチドとの融合タンパク質を発現させることができる。ここで得られる融合タンパク質にもDHFRの酵素活性も保持されているので、この融合タンパク質の精製はDHFRの特性と活性を利用して容易に行うことができる。

また、感染症の診断法としては遺伝子検査法もある。これは、核酸プローブ等を用いて検体中に検出対象の微生物の遺伝子が存在するか否かを調べる方法である。

クラミジア・ニューモニエの遺伝子検査法としては、特表昭64-500083号公報、米国特許第5,281,518号公報、及び国際公開公報94/04549号公報に記載された方法が知られている。

しかし、特表昭64-500083号公報及び米国特許第5,281,518号公報には、クラミジア・ニューモニエ染色体DNAそのもの又は染色体DNAを制限酵素等で分解して得られるDNA断片をプローブとして用いることが記載されているだけであり、これらのDNAの塩基配列は明らかではなく、それゆえ、プローブの特異性が定かではなく、また反応条件の設定も困難である。

一方、国際公開公報94/04549号公報に記載された方法は、リボソームRNA又はそれをコードするDNAにハイブリダイズするプローブを用いるものであるが、リボソームRNAはすべての生物において比較的相同性が高いため、

このプローブの特異性も定かではない。

発明の開示

本発明は、クラミジア・トラコマチスやクラミジア・シッタシ等のクラミジア・ニューモニエ以外のクラミジア属細菌に対する抗体に反応せず、クラミジア・ニューモニエ特異的抗体とのみ反応し、これを検出するための抗原ポリペプチドを提供することを目的とする。

更には、本発明は、遺伝子組換え技術を用いてこの抗原ポリペプチドを大量に合成する技術を提供することも目的とする。

更には、本発明は、この抗原ポリペプチドを利用する、抗クラミジア・ニューモニエ特異的抗体の製造方法、抗クラミジア・ニューモニエ特異的抗体の検出・測定方法及びその試薬、並びにクラミジア・ニューモニエ感染の診断薬を提供することも目的とする。更には、本発明は、クラミジア・ニューモニエ遺伝子の特異的に検出・測定するためのプローブ及びプライマーを提供し、さらに、このプローブ又はプライマーを利用する、クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定方法及び試薬、並びにクラミジア・ニューモニエ感染の診断薬を提供することも目的とする。

更には、本発明は、クラミジア・ニューモニエ、クラミジア・トラコマチス、クラミジア・シッタシ等のクラミジア属細菌に共通に反応する抗体を検出するための抗原ポリペプチドを提供することも目的とする。

発明の概要

本発明は、下記(1)～(45)に関するものである。

(1) 配列番号1のポリペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸配列を含むポリペプチド(以下、「ポリペプチドA」という)からなる、クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチド。

(2) ポリペプチドAが、配列番号1のポリペプチドからアミノ酸が欠落しているポリペプチドである、上記(1)記載の抗原ポリペプチド。

(3) ポリペプチドAが、配列番号1のポリペプチドの中のアミノ酸が他のアミ

ノ酸で置換されているか、又は配列番号1のポリペプチドの中にアミノ酸が挿入されているポリペプチドである、上記(1)記載の抗原ポリペプチド。

(4) ポリペプチドAが、配列番号1のポリペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸配列にアミノ酸若しくはペプチドが結合したポリペプチドである、上記(1)記載の抗原ポリペプチド。

(5) ポリペプチドAが配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、上記(1)記載の抗原ポリペプチド。

(6) ポリペプチドAが配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、上記(1)記載の抗原ポリペプチド。

(7) ポリペプチドAが配列番号5のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、上記(1)記載の抗原ポリペプチド。

(8) 上記(1)～(7)のいずれかに記載の抗原ポリペプチドをコードするDNA若しくはそれに相補的なDNA。

(9) 塩基配列が配列番号3の塩基配列である、上記(8)記載のDNA。

(10) 塩基配列が配列番号4の塩基配列である、上記(8)記載のDNA。

(11) 塩基配列が配列番号7の塩基配列である、上記(8)記載のDNA。

(12) 上記(8)～(11)のいずれかに記載のDNAを含む組換えベクター。

(13) 組換えベクターが配列番号10の塩基配列を有するpCPN533αプラスミドである、上記(12)記載の組換えベクター。

(14) 上記(12)又は上記(13)記載の組換えベクターを含む形質転換体。

(15) 上記(1)～(7)のいずれかに記載の抗原ポリペプチドを抗原として用いることを特徴とする、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の製造方法。

(16) 上記(1)～(7)のいずれかに記載の抗原ポリペプチドを抗原として用いることを特徴とする、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定方法。

(17) 上記(1)～(7)のいずれかに記載の抗原ポリペプチドを抗原として含有してなる、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定用試薬。

(18) 上記(1)～(7)のいずれかに記載の抗原ポリペプチドを有効成分とする、クラミジア・ニューモニエ感染の診断薬。

(19) 配列番号14のポリペプチドに、直接に又は介在アミノ酸配列を介して、配列番号1のポリペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸配列を含むポリペプチド（以下「ポリペプチドB」という）が結合した、ジヒドロ葉酸還元酵素－クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチド融合タンパク質。

(20) ポリペプチドBが、配列番号1のポリペプチドからアミノ酸が欠落しているポリペプチドである、上記(19)記載の融合タンパク質。

(21) ポリペプチドBが、配列番号1のポリペプチドの中のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されているか、又は配列番号1のポリペプチドの中にアミノ酸が挿入されているポリペプチドである、上記(19)記載の融合タンパク質。(22) 融合タンパク質が配列番号15のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、上記(19)記載の融合タンパク質。

(23) 融合タンパク質が配列番号16のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、上記(19)記載の融合タンパク質。

(24) 上記(19)～(23)のいずれかに記載の融合タンパク質をコードするDNA若しくはそれに相補的なDNA。

(25) 塩基配列が配列番号17の塩基配列である、上記(24)記載のDNA。

(26) 塩基配列が配列番号18の塩基配列である、上記(24)記載のDNA。

(27) 上記(24)～(26)のいずれかに記載のDNAを含む組換えベクター。

(28) 組換えベクターがpCPN533Tプラスミドである上記(27)記載の組換えベクター。

(29) 上記(27)又は上記(28)記載の組換えベクターを含む形質転換体。

(30) 上記(19)～(23)のいずれかに記載の融合タンパク質を抗原として用いることを特徴とする、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の製造方法。

(31) 上記(19)～(23)のいずれかに記載の融合タンパク質を抗原として用いることを特徴とする、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定方法。

(32) 上記(19)～(23)のいずれかに記載の融合タンパク質を抗原として含有してなる、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定用試薬。

(33) 上記(19)～(23)のいずれかに記載の融合タンパク質を有効成分

とする、クラミジア・ニューモニエ感染の診断薬。

(34) (a) 配列番号3のDNAの中の連続した少なくとも10塩基の塩基配列を有するDNA、

(b) 上記(a)のDNAに相補的なDNA、又は

(c) 上記(a)若しくは(b)のDNAと90%以上の相同性を有するDNA、のいずれかを含有するDNAからなる、クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用プローブ。

(35) 塩基配列が配列番号19の塩基配列である、上記(34)記載のプローブ。

(36) 塩基配列が配列番号20の塩基配列である、上記(34)記載のプローブ。

(37) 上記(34)～(36)のいずれかに記載のプローブを用いる、クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定方法。

(38) 上記(34)～(36)のいずれかに記載のプローブを含有してなるクラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用試薬。

(39) 上記(34)～(36)のいずれかに記載のプローブを有効成分とする、クラミジア・ニューモニエ感染の診断薬。

(40) (a) 配列番号3のDNAの中の連続した少なくとも10塩基の塩基配列を有するDNA、

(b) 上記(a)のDNAに相補的なDNA、又は

(c) 上記(a)若しくは(b)のDNAと90%以上の相同性を有するDNA、のいずれかを含有するDNAからなる、クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用プライマー。

(41) 塩基配列が配列番号19の塩基配列である、上記(40)記載のプライマー。

(42) 塩基配列が配列番号20の塩基配列である、上記(40)記載のプライマー。

(43) 上記(40)～(42)のいずれかに記載のプライマーを用いる、クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定方法。

(44) 上記(40)～(42)のいずれかに記載のプライマーを含有してなるクラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用試薬。

(45) 上記(40)～(42)のいずれかに記載のプライマーを有効成分とする、クラミジア・ニューモニエ感染の診断薬。

また、本発明は、下記(46)～(52)に関するものでもある。

(46) (a) 配列番号5のポリペプチド；

(b) 配列番号5のポリペプチド中のアミノ酸の1又は2以上に欠落のあるポリペプチド；(c) 配列番号5のポリペプチド中のアミノ酸の1又は2以上が他のアミノ酸で置換されたポリペプチド；及び

(d) 上記(a)～(c)のいずれかのポリペプチドに他のアミノ酸もしくはペプチドが結合してなる融合ポリペプチド、

からなる群から選ばれるクラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチド。

(47) (a) 配列番号6のポリペプチド；

(b) 配列番号6のポリペプチド中のアミノ酸の1又は2以上に欠落のあるポリペプチド；(c) 配列番号6のポリペプチド中のアミノ酸の1又は2以上が他のアミノ酸で置換されたポリペプチド；及び

(d) 上記(a)～(c)のいずれかのポリペプチドに他のアミノ酸もしくはペプチドが結合してなる融合ポリペプチド、

からなる群から選ばれるクラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチド。

(48) 上記(46)のポリペプチドをコードするDNA、又はそれに相補的なDNA。

(49) 上記(47)のポリペプチドをコードするDNA、又はそれに相補的なDNA。

(50) 上記(46)のポリペプチドをコードするDNAが配列番号7である、上記(48)のDNA。

(51) 上記(47)のポリペプチドをコードするDNAが配列番号8である、上記(49)のDNA。

(52) 上記(48)～(51)のいずれかのDNAを含む、組換えベクター。

発明の詳細な説明

本明細書において、塩基の数が1のデオキシヌクレオチドはモノデオキシヌクレオチドといい、塩基の数が2以上のデオキシヌクレオチドは、特に断らない限り、DNAと総称した。

以下、本発明を詳細に説明する。

抗原ポリペプチド

本発明の抗原ポリペプチドは、ペプチドが抗原性を有する最小の大きさの観点から、配列番号1のポリペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸配列を含むポリペプチド（以下「ポリペプチドA」という）からなるものである。

アミノ酸配列が長いほうが高感度の抗原抗体反応を期待できることから、ポリペプチドAとしては、望ましくは20個以上、より望ましくは100個以上、さらに望ましくは250個以上のアミノ酸からなるものがよい。

また、クラミジア・ニューモニエとしての抗原性を有していれば、ポリペプチドAとしては、配列番号1のポリペプチドからアミノ酸（例えば1～250個）が欠落しているものであってもよい。欠落するアミノ酸の個数が多すぎると、ポリペプチドAのクラミジア・ニューモニエとしての抗原性が損なわれる傾向がある。

欠落するアミノ酸の個数が多い場合（例えば5個以上）、クラミジア・ニューモニエとしての抗原性を保つ上から、ポリペプチドAは、アミノ酸が連続して（例えば5個以上）欠落しているものであることが好ましい。

また、クラミジア・ニューモニエとしての抗原性を有していれば、ポリペプチドAとしては、配列番号1のポリペプチドの中のアミノ酸（例えば1～100個）が他のアミノ酸で置換されているものであってもよいし、あるいは、配列番号1のポリペプチドの中にアミノ酸（例えば1～100個）が挿入されているものであってもよい。置換又は挿入されるアミノ酸の数が多すぎると、ポリペプチドAのクラミジア・ニューモニエとしての抗原性が損なわれる傾向がある。置換又は挿入されるアミノ酸の個数が多い場合（例えば5個以上）、クラミジア・ニ

ニューモニエとしての抗原性を保つ上から、ポリペプチドAは、アミノ酸が連続して（例えば5個以上）置換又は挿入されているものであることが好ましい。置換されるアミノ酸は類似の性質を有するものが好ましく、例えば、グリシンとアラニンの置換がある。

また、クラミジア・ニューモニエとしての抗原性を有していれば、ポリペプチドAとしては、配列番号1のポリペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸配列に直接又は介在アミノ酸配列を介してアミノ酸若しくはペプチドが結合したポリペプチドであってもよい。

このようなペプチドは、クラミジア・ニューモニエとしての抗原性を保つ上から、1000個以下のアミノ酸配列からなるものが好ましく、500個以下のアミノ酸配列からなるものがより好ましく、200個以下のアミノ酸配列からなるものがさらに好ましい。

このようなアミノ酸若しくはペプチドとしては、例えば、ロイシン、ロイシン-メチオニン、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）、 β -ガラクトシダーゼ等がある。

ペプチドとしてDHFRや β -ガラクトシダーゼ等を用いた場合のポリペプチドAとしては、例えば、DHFR-クラミジア・ニューモニエ抗原ポリペプチド融合タンパク質や β -ガラクトシダーゼ-クラミジア・ニューモニエ抗原ポリペプチド融合タンパク質がある。DHFRや β -ガラクトシダーゼとクラミジア・ニューモニエ抗原ポリペプチドとは、直接結合してもよいし、介在アミノ酸配列を介してもよい。

ポリペプチドAの具体例としては、例えば、配列番号1、配列番号2、及び配列番号5のポリペプチドがある。

介在アミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、ロイシン、ロイシン-メチオニンのアミノ酸配列等がある。

本発明の融合タンパク質の具体例としては、配列番号15のアミノ酸配列からなるポリペプチドや配列番号16のアミノ酸配列からなるポリペプチドがある。

上記融合タンパク質の中では、クラミジア・ニューモニエの53KDaの抗原ポリペプチド全体を含む配列番号15のアミノ酸配列からなるポリペプチドが望

ましい。

本発明の抗原ポリペプチドを製造する方法としては、化学合成法や遺伝子組換え法がある。

本発明の配列番号 1 のポリペプチドは、配列表に示すとおり、488 個のアミノ酸残基から成る抗原ポリペプチドである。

本発明の配列番号 2 のポリペプチドは、配列表に示すとおり、271 個のアミノ酸残基から成る抗原ポリペプチドである。

本発明の配列番号 5 のポリペプチドは、配列表に示すとおり、259 個のアミノ酸残基から成る抗原ポリペプチドである。

上記抗原ポリペプチドの中では、クラミジア・ニューモニエの 53 KDa の抗原ポリペプチド全体を含む配列番号 1 のポリペプチドが望ましい。

抗原ポリペプチドの製造方法

本発明の抗原ポリペプチドを製造する方法では、化学合成法や遺伝子組換え法がある。

化学合成法としては、例えば、マップ (Multiple Antigen Peptide, MAP) 法があり、30 個以下のアミノ酸配列からなるペプチドの合成に適しており、市販のペプチド合成機を使用して合成することができる。

遺伝子組換え法としては、例えば、本発明の抗原ポリペプチドをコードする DNA をベクターに挿入して組換えベクターを構築し、それを宿主に挿入して形質転換体を作製し、その形質転換体から目的のペプチドを精製する方法がある。

本発明の抗原ポリペプチドをコードする DNA については後述する。

ベクターとしては、例えば、プラスミドやファージ等がある。

宿主としては、例えば、大腸菌、枯草菌、酵母等がある。

以下、形質転換体の作製法と、その形質転換体を用いた目的のペプチドの精製法について詳しく説明する。

抗原ポリペプチドをコードする DNA を含む組換えベクターの作製、及びそれを含む形質転換体の作製

スクリーニングで取得した λ ファージ自体（後述）も本発明のDNAを含む組換えベクターであるが、クラミジア・ニューモニエ抗原ポリペプチドをコードするDNA（後述）を常法で既存のプラスミドベクターやファージベクター等に挿入して、新たに組換えベクターを作製することもできる。その際、必要に応じ、リンカーを使用する。既存のプラスミドベクターとしては、例えばpBR322、pUC18、pUC19、pBBK10MM等を使用することができる。pBR322、pUC18、pUC19は市販されており、また、pBBK10MMについては特開平4-117284号公報に詳細に記載されている。また、ファージベクターとしては λ gt11ファージ、 λ gt10ファージ等が利用できる。いずれも、用いた親ベクターに対応する組換えベクターが得られる。

本発明のDNAを含む組換えベクターとしては、後述するようにpCPN533 α プラスミド、53-3S λ ファージ等がある。

得られた組換えベクターを宿主に入れ、形質転換体を作製する。大腸菌由来のプラスミドや λ ファージを使用する場合は宿主としては大腸菌を使用することができ、例えば大腸菌HB101株を使用することができる。この宿主をコンピテントセルとなるように処理をする。大腸菌HB101株を処理して得たコンピテントセルは宝酒造から販売されている。上記連結の反応物を宿主に入れ、形質転換体を作製する方法は文献「モレキュラー・クローニング」に記載されている。

得られた形質転換体を培養してコロニーを形成させ、各コロニーからプラスミドDNAを取得し、適切な制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動で分析し、所望の組換えプラスミドをもつ形質転換体を選択する。このようにして作製されたプラスミドベクターとしては、例えばpCPN533 α プラスミドがある。

このようにして作製された形質転換体をととしては、前述の組換えベクターpCPN533 α が入った大腸菌HB101株がある。

DHFR-クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチド融合タンパク質をコードするDNAを含む組換えベクターの作製、及びそれを含む形質転換体の作製

クラミジア・ニューモニエ抗原ポリペプチドをコードするDNA（後述）と、DHFRをコードするDNA（後述）とを、市販のキットを使用して連結する。その際、必要に応じ、リンカーを使用する。市販のキットとしては例えば、DNAライゲーションキット（宝酒造）を用いることができる。連結によって得られたDNAが複製起点をもたず、プラスミドとしては機能しない場合はこのDNAを新たなプラスミドベクターに挿入する。この新たなプラスミドベクターとしては、例えばpBR322、pUC18等を使用することができる。

上記連結の反応物を宿主に入れ、形質転換体を作製する。大腸菌由来のプラスミドを使用する場合は宿主としては大腸菌を使用することができ、例えば大腸菌HB101株を使用することができる。この宿主をコンピテントセルとなるように処理をする。大腸菌HB101株を処理して得たコンピテントセルは宝酒造から販売されている。上記連結の反応物を宿主に入れ、形質転換体を作製する方法は文献“モレキュラー・クローニング”に記載されている。

得られた形質転換体を培養してコロニーを形成させ、各コロニーからプラスミドDNAを取得し、適切な制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動で分析し、所望の組換えプラスミドをもつ形質転換体を選択する。このようにして作製されたプラスミドベクターとしては、例えばpCPN533Tプラスミドがある。

このようにして作製された形質転換体としては、前述の組換えベクターpCPN533Tが入った大腸菌HB101株がある。

形質転換体の培養は、その形質転換体が成長しうる培地でこの抗原ポリペプチドが形質転換体内に十分蓄積されるまで適温で培養器を振とうする。形質転換体として前述の組換えベクターpCPN533 α やpCPN533Tが入った大腸菌HB101株を使用する場合は、アンピシリンを含むLB培地で37℃で一晩振とう培養し、その後、この培養液をアンピシリンを含むTB培地等に接種してさらに37℃で一晩振とう培養する。TB培地の調製方法は、文献“モレキュラー・クローニング”に記載されている。

培養した形質転換体を破碎する場合には、遠心分離で形質転換体を集め、緩衝液に懸濁し、これに超音波を照射する。形質転換体が大腸菌の場合は、上記懸濁

液にリゾチームを加え、SDSを含む緩衝液を加えることによって菌体を溶菌させてもよい。

一方、目的のポリペプチドが分泌性のものである場合は、培養液を遠心分離して上清を取得する。

形質転換体の破碎後、遠心分離して細胞残渣を除去し、上清を取得する。上記のいずれかの上清にストレプトマイシン硫酸塩を添加し、しばらく攪拌し、遠心分離することによって、核酸を沈殿物として除去し、上清を取得する。

この上清を硫酸沈殿し、遠心分離する。通常、沈殿を取得するが、目的のペプチドが上清に含まれることもあり、サンプリングして目的のペプチドの有無を確認しておく。

この沈殿を少量の緩衝液に溶かしたものか、又は上記上清を液体クロマトグラフィーによって分画し、各画分に含まれる蛋白質について、前述のクラミジア・ニューモニエ特異的モノクローナル抗体を用い、ウェスタン・ブロット法を行い、抗原ポリペプチドを含む画分を取得する。ポリペプチドAがDHFRとの融合タンパク質である場合は、液体クロマトグラフィー用カラムとして、メソトレキセートカラムが使用できる。細胞膜等の残渣の除去、ストレプトマイシン硫酸塩を添加するDNAの除去、硫酸アンモニウムを添加する蛋白質の取得、及びウェスタン・ブロット法の具体的方法は、文献“モレキュラー・クローニング”に記載されている。

抗原ポリペプチドをコードするDNA

本発明において、配列番号1のポリペプチドをコードするDNAとは、配列番号1のポリペプチドをトリプレット暗号表（それぞれのアミノ酸に対して、1～6通りのヌクレオチド配列が割り当てられている）に従ってアミノ酸をヌクレオチド配列に読み替えた時のDNA群（この中には、配列番号3のDNAも含まれる）から選ばれるDNAのことである。

抗原ポリペプチドAをコードするDNAとは、ポリペプチドAをコードするDNAであり、このDNAは、ポリペプチドAのアミノ酸配列をトリプレット暗号表に従ってアミノ酸をヌクレオチド配列に読み替えたDNA群から選ばれるDN

Aのことである。

ポリペプチドAとしては、前記抗原ポリペプチドの項で説明したものが挙げられ、ポリペプチドAをコードするDNAもそれらのポリペプチドのアミノ酸配列に対応したヌクレオチド配列のものがある。

同様に、本発明において、配列番号2のポリペプチドをコードするDNAとは、配列番号2のポリペプチドをトリプレット暗号表（それぞれのアミノ酸に対して、1～6通りのヌクレオチド配列が割り当てられている）に従ってアミノ酸をヌクレオチド配列に読み替えた時のDNA群（この中には、配列番号4のDNAも含まれる）から選ばれるDNAのことである。

また、配列番号5のポリペプチドをコードするDNAとは、配列番号5のポリペプチドをトリプレット暗号表に従ってアミノ酸をヌクレオチド配列に読み替えた時のDNA群（この中には、配列番号7のDNAも含まれる）から選ばれるDNAのことである。

また、配列番号6のポリペプチドをコードするDNAとは、配列番号6のポリペプチドをトリプレット暗号表に従ってアミノ酸をヌクレオチド配列に読み替えた時のDNA群（この中には、配列番号8のDNAも含まれる）から選ばれるDNAのことである。

融合タンパク質をコードするDNAは、融合タンパク質のアミノ酸配列に対応する遺伝暗号から構成されるものであれば特に限定されないが、例えば配列番号17の塩基配列や配列番号18の塩基配列がある。

配列番号17の塩基配列は、DHFRとクラミジア・ニューモニエ53kDa抗原ポリペプチド全体との融合タンパク質をコードするDNAの塩基配列となっており、配列番号18の塩基配列は、DHFRとクラミジア・ニューモニエ53kDa抗原ポリペプチド（一部）との融合タンパク質をコードするDNAの塩基配列となっている。

これらのDNAは、化学合成法か遺伝子組換え法で作製することができる。

化学合成法としては、例えば、ホスホアミダイド法があり、全長が100塩基以下の塩基配列からなるDNAの合成に適しており、市販のDNA合成機で化学

合成することができる。

遺伝子組換え法としては、例えば、前述したような方法でクラミジア・ニューモニエの基本小体からDNAをクローニングする方法や、既を取得したDNAを鋳型にし、そのDNAの任意の位置の塩基配列を元にして作製したプライマーを利用したPCR法等がある。遺伝子組換え法は、100塩基以上の長いDNAの作製も可能である。

次に、クラミジア・ニューモニエの基本小体から抗原ポリペプチドをコードするDNAのクローニング方法について詳しく説明する。

クラミジア・ニューモニエの培養

培養したHL細胞から細胞浮遊液を調製し、培養上清を除去した後にクラミジア・ニューモニエの浮遊液を添加してこれを培養し、遠心分離してクラミジア・ニューモニエ感染HL細胞を取得する。クラミジア・ニューモニエとしては、例えばクラミジア・ニューモニエYK41株(金本ら：ミクロバイオリジカル・イムノロジー、37巻、495-498頁、1993年(Y. Kanamoto et al., Microbiol. Immunol., Vol. 37, p. 495-498, 1993))が使用できる。

クラミジア・ニューモニエの基本小体の精製

クラミジア・ニューモニエ感染HL細胞を破碎し、遠心分離し、上清を回収する。ウログラフィン(シェーリング社製)を用いた連続密度勾配液にこの上清を添加して遠心分離する。予備実験で黄色味がかかった白いバンドの中にクラミジア・ニューモニエの基本小体が含有されていることを電子顕微鏡で確認しているので、このバンドを回収する。

クラミジア・ニューモニエのゲノムDNAの調製

クラミジア・ニューモニエの基本小体を、1 mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含む10 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)(以下、TE緩衝液という。)に懸濁し、1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)水溶液及び1 mg/ml プロテイナーゼK水溶液を加えて保温し、基本小体を溶解させる。0.1 M

トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 飽和フェノールを加えて攪拌し、遠心分離し、水層を回収する。さらにRNA分解酵素 (RNase) 処理をし、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール処理とエタノール沈殿処理をし、クラミジア・ニューモニエのゲノムDNAを取得する。

ゲノムDNA発現ライブラリーの作製

ゲノムDNAを制限酵素AccI、HaeIII及びAluIで消化し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール処理とエタノール沈殿処理をし、部分消化DNAを取得する。この部分消化DNAにリンカー、アデノシン-5'-三リン酸 (adenosine 5'-triphosphate、以下、ATPと略す。) 及びT4リガーゼを添加して、部分消化DNAにリンカーを付加させる。

これを、0.1M NaCl及び1mM EDTA含有10mMトリス-塩酸緩衝液を移動相とするクロマ・スピン6000 (Chroma spin 6000) カラムにかけ、溶出液を分取し、1kbpから7kbpのDNA断片を含む分画を回収する。得られた分画にATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼを加えて反応させ、DNA断片の5'端をリン酸化する。反応液をフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール処理及びエタノール沈殿処理し、5'端がリン酸化されたDNA断片を取得する。

このDNA断片に、予め制限酵素EcoRIで切断しておいたλgt11DNA、ATP及びT4リガーゼを加えて反応させ、市販のパッケージングキットを用い、得られた組換えλgt11DNAをパッケージングし、ゲノムDNA発現ライブラリーを作製する。

抗原ポリペプチドをコードするDNAのクローニング

大腸菌Y1090 r-株の培養液に上記ゲノムDNA発現ライブラリーを感染させ、寒天培地上で培養し、イソプロピルチオ-β-D-ガラクトシド (IPTG) 水溶液に浸漬したニトロセルロースフィルターを利用して、挿入DNAの発現により菌体内に産生されたタンパク質をニトロセルロースフィルターに付着させる。このフィルターを牛血清アルブミンを用いてブロッキング反応させ、洗浄

し、次いでフィルターをクラミジア・ニューモニエ特異的モノクローナル抗体と反応させる。クラミジア・ニューモニエ特異的モノクローナル抗体としては、例えば、AY6E2E8やSCP53を使用することができる。AY6E2E8を産生するハイブリドーマは工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERMBP-5154として寄託されている。また、SCP53を産生するハイブリドーマについてはジャーナル・オブ・クリニカル・ミクロバイオロジー、132巻、583-588頁(1994) (J. Clin. Microbiol., Vol. 132, p. 583-588, 1994)に記載されている。反応後、フィルターを洗浄し、パーオキシダーゼ等の酵素で標識された抗マウスIgG抗体を反応させる。反応後、フィルターを洗浄し、発色基質液を添加して反応させる。発色基質液としては、例えば、過酸化水素水溶液及び4-クロロ-1-ナフトールのメタノール溶液を含む液を利用することができる。反応後、フィルターを洗浄し、風乾させる。

フィルターの発色スポットに対応する寒天培地上のブランクを同定し、ブランクに含まれるλファージを取得する。ブランクが全て上記モノクローナル抗体と反応するようになるまで前記操作を繰り返し、抗原ポリペプチドをコードするDNAをクローン化し、クラミジア・ニューモニエ特異的モノクローナル抗体反応性のクラミジア・ニューモニエ特異的抗原ポリペプチドを発現するλファージを取得する。

クラミジア・ニューモニエ抗原ポリペプチドをコードするDNAの取得

取得したλファージを大腸菌Y1090 r-株に感染させ、培養し、λファージを大量に生産する。市販のキットを用いてλファージからDNAを取得・精製する。このDNAにプライマー、タックポリメラーゼ (Taq Polymerase) 及びデオキシヌクレオチド類を添加し、加熱、冷却、保温の工程を繰り返し、λgt11に挿入されたDNAを増幅させる。プライマーとしては、例えば、λgt11・フォワード・プライマー (λgt11 forward primer) 及びλgt11・リバーズ・プライマー (λgt11 reverse primer) (いずれも宝酒造株式会社製) があり、タックポリメラーゼとしては、例えば、アンブリタック・DNA・ポリメラーゼ (AmpliTaq DNA Polymerase) がある。このDNA増幅方法の一般的手法はPCR法とし

て知られており、詳細は「サンプラック他編集、モレキュラー・クローニング 第2版(コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー)(1989年)」(J. Sambrook et al., Molecular Cloning 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、以下、本文献を文献“モレキュラー・クローニング”という)に記載されている。

増幅されたDNAを取得し、塩基配列を決定・解析する。DNAの取得には市販のキットを使用することができ、例えばウイザード・PCR・プレップキット(Wizard PCR Prep kit)(プロメガ(Promega)社製品)を使用することができる。また、塩基配列を決定はタックポリメラーゼを用いた蛍光標識ターミネータサイクルシーケンス法で行うことができ、この方法を用いるには、パーキン・エルマー・ジャパン社から販売されているキットを使用することができる。また、分析にあたっては市販の機械、例えば373A型DNAシーケンサ(アプライドバイオシステムズ社)を利用することができる。

塩基配列の決定後、得られたDNA塩基配列を遺伝子配列分析ソフトで解析し、編集、連結、アミノ酸翻訳領域の推定を行なう。遺伝子配列分析ソフトとしては、「DNASIS」(日立ソフトウェアエンジニアリング社)を用いることができる。

解析の結果、完全長の遺伝子が取得できていない場合は、既に取得されているDNAの前後のDNAをゲノムウォーキングによって取得する。ゲノムウォーキングを行うには、宝酒造(株)から販売されているキットを使用することができる。

DHFRをコードするDNAの調製

DHFRをコードするDNAは、そのDNAを含むプラスミドベクターから制限酵素を用いてそのDNAを切り出すか、あるいはそのDNAを有するプラスミドDNAやゲノムDNAを鋳型とし、適切なプライマーを用いてPCR法を行ってそのDNAを増幅することによって取得する。

前者の方法では、DHFRをコードするDNAを含むプラスミドベクターとして、例えばプラスミドベクターpBBK10MMや本発明の組換えベクターでもあるpCPN533Tを利用することができる。pCPN533Tを含む大腸菌、

pBBK10MMを含む大腸菌は、それぞれ、受託番号FERM BP-5222、FERM BP-2374として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。この大腸菌(プラスミド保持菌)からプラスミドを取得するには、通常のプラスミドDNA取得方法に従えば良く、この方法は文献“モレキュラー・クローニング”に記載されている。プラスミドpBBK10MMを用いる場合は制限酵素としてBamHI及びXhoIを使用し、約4.6KbpのDNA断片を切り出せばよい。

後者の方法では、プラスミドDNAとして例えば前述のpBBK10MMやpCPN533Tをそのまま利用することができ、ゲノムDNAとしては例えば枯草菌のゲノムDNAを使用することができる。ゲノムDNAを取得するには通常のゲノムDNA取得方法に従えば良く、この方法は文献“モレキュラー・クローニング”に記載されている。

後者の方法に使用するプライマーは、DHFRをコードするDNAの5'末端と3'末端にある塩基配列を考慮して設計・合成することができる。例えば配列番号5の塩基配列の1番目から20番目の配列を有するオリゴヌクレオチドと461番目から480番目の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを使用することができる。これらのオリゴヌクレオチドは市販のDNA合成機を用いて化学合成することができる。

上記抗原ポリペプチドの中では、クラミジア・ニューモニエの53KDaの抗原ポリペプチド全体を含む配列番号1のポリペプチドが望ましい。

抗原ポリペプチドを抗原として用いる抗クラミジア・ニューモニエ抗体の製造方法

抗クラミジア・ニューモニエ抗体を製造するには、本発明の抗原ポリペプチドを抗原としてマウスを免疫し、その脾臓細胞を骨髓腫細胞株と融合させてハイブリドーマを作製し、その中からクラミジア・ニューモニエの53KDaの抗原ポリペプチドを認識するハイブリドーマを選択し、これを培養することによって得ることができる。

骨髓腫細胞株としては、例えばP3X63Ag8.653(ATCC CRL

-1580)やP3/NSI/1-Ag4-1(ATCC TIB-18)を使用することができる。

抗原として本発明の抗原ポリペプチドを使用すること以外は、マウスを免疫して抗体を得る公知の一般的手法に従い、抗クラミジア・ニューモニエ抗体を製造する。

抗原ポリペプチドを抗原として用いる抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定方法及び試薬、並びに抗原ポリペプチドを有効成分とするクラミジア・ニューモニエ感染の診断薬

抗クラミジア・ニューモニエ抗体を検出・測定するには、例えば、上記抗原ポリペプチドを担体に固定化し、検体を添加し、洗浄し、標識化された二次抗体を添加し、洗浄し、この標識を直接的又は間接的に検出・測定する。

担体としては、例えば、ラテックスの粒子やセルロースの糸、その他プラスチック製のアッセイプレートや粒子等を利用することができる。

上記抗原ポリペプチドを担体に固定化するには、例えば共有結合や物理吸着を利用する。

検体としては、例えばヒトの血清等を使用する。なお、検体中の他の抗体等が担体に非特異的に結合するのを防止するため、検体の添加前に牛血清アルブミン等で担体の表面をブロッキングしておくことが望ましい。

洗浄は界面活性剤を含むリン酸緩衝液等を利用して行う。

標識化された二次抗体としては、例えば標識化された抗ヒトモノクローナル抗体がある。標識としては種々のものが利用でき、例えばアルカリフォスファターゼ (Alkaline phosphatase)、ルシフェラーゼ (Luciferase)、ペルオキシダーゼ (Peroxidase)、 β -ガラクトシダーゼ (β -galactosidase)等の酵素、フルオレセイン (Fluorescein)等の蛍光物質を利用することができる。また、抗体と標識物の間にビオチン (Biotin)、アビジン (Avidin)、ストレプトアビジン (Streptoavidin)、ディゴキシゲニン (Digoxigenin)等の化学物質を介在させてもよい。

標識を直接的又は間接的に検出・測定するには、例えば、その標識が酵素であ

る場合は基質を添加し、酵素の触媒作用により発生する光や発色を検出・測定するか吸光度の変化を測定する。また、標識が蛍光物質である場合は反応系に紫外線を照射し、発生する蛍光を検出・測定する。必要に応じ、増感剤を使用する。

上記抗原ポリペプチドを抗原として用いる抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定用試薬としては、例えば上記抗原ポリペプチドを担体に固定化したものやさらに上記標識化された二次抗体や基質等が必要量同封されたものがある。

上記抗原ポリペプチドを有効成分とするクラミジア・ニューモニエ感染の診断薬としては、例えば上記試薬をそのまま利用することができる。

クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用プローブ及びプライマー

クラミジア・ニューモニエに特異的である 53 KDa 抗原ポリペプチドをコードする DNA は配列番号 3 の塩基配列を有する。

本発明のプローブ及びプライマーは、

- (a) 配列番号 3 の DNA 中の連続した少なくとも 10 塩基の塩基配列を有する DNA、
 - (b) 上記 (a) の DNA に相補的な DNA、又は
 - (c) 上記 (a) 若しくは (b) の DNA と 90% 以上の相同性を有する DNA、
- のいずれかを含有する DNA からなる。

塩基配列の長さとしては、10～50 塩基が好ましく、より好ましくは 15～20 塩基である。

本発明のプローブ及びプライマーの具体例としては、例えば、配列番号 19 の塩基配列からなる DNA や配列番号 20 の塩基配列からなる DNA がある。

本発明のプローブ及びプライマーは市販の DNA 合成装置を使用して容易に合成することができる。DNA 合成装置はアプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) 社等で販売されている。また、予め短い DNA 断片を化学合成し、これをプライマーとして後述の PCR 法を行って長い DNA 断片を作製すること

もできる。

本発明のプロープ及びプライマーには、上記DNAを標識物で標識されたものも含まれる。

標識物としては、例えば、ビオチン (Biotin)、アビジン (Avidin)、ストレプトアビジン (Streptoavidin)、ディゴキシゲニン (Digoxigenin) 等の化学物質、アルカリフォスファターゼ (Alkaline phosphatase)、ルシフェラーゼ (Luciferase)、ペルオキシダーゼ (Peroxidase)、 β -ガラクトシダーゼ (β -galactosidase) 等の酵素、フルオレセイン (Fluorescein) 等の蛍光物質がある。プロープにビオチンを付加させるには、例えば、ターミナルトランスフェラーゼ (Terminal transferase) 存在下で、プロープにビオチン化されたデオキシウリジン-5'-三リン酸 (deoxyuridine 5'-triphosphate) を添加する。ターミナルトランスフェラーゼやビオチン化されたデオキシウリジン-5'-三リン酸はキットとしてベーリンガーマンハイム (Boehringer Mannheim) 社から購入できる。ビオチン以外の標識物を付加する場合も市販のキットを使用することができ、このようなキットは宝酒造(株)や東洋紡(株)から購入できる。また、文献"モレキュラー・クローニング"に記載されている方法に従って標識物を付加させてもよい。

また、標識物としては放射性同位元素を利用することもでき、その場合は例えば、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (T4 polynucleotide kinase) 存在下、これに(γ - ^{32}P) dATPを添加する。放射性同位元素で標識する一般的手法は文献"モレキュラー・クローニング"に記載されている。T4ポリヌクレオチドキナーゼは東洋紡(株)から、(γ - ^{32}P) dATPは(株)アマシャムから購入できる。

なお、構成成分がDNAである本発明のプロープやプライマーの代わりに、本発明のプロープやプライマーの塩基配列に対応するRNA、即ち、塩基としてチミンがウラシルに置換され、糖としてデオキシリボースがリボースに置換された核酸、も本発明のプロープやプライマーとして使用でき、これらの構成成分がRNAであるプロープやプライマーも本発明の検出・測定方法や検出・測定用試薬に使用することができ。

クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定方法

本発明のプロープを用いてクラミジア・ニューモニエ遺伝子を検出・測定するには、例えば、検体中のDNAを電気泳動して分子量で分離し、そのDNAをニトロセルロースフィルターやナイロンメンブレン等に移して固定し、標識化された本発明のプロープを添加し、標識を検出・測定する。この方法はサザンブロット法と呼ばれており、その一般的手法は文献“モレキュラー・クローニング”に記載されている。

本発明のプライマーを用いてクラミジア・ニューモニエ遺伝子を検出・測定するには、例えばPCR法を行う。PCR法については既に述べているが、本発明のプライマーを用いてPCR法を行うクラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定方法の具体的な工程は、下記の通りである。

(ア) DNAを含む検体に、本発明のプライマー、DNAポリメラーゼ、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPを含む緩衝液を添加し、加熱する。

(イ) 冷却し、保温し、加熱する。

(ウ) (イ)の操作を繰返す。

(エ) 反応液に含まれるDNAを検出・測定する。

工程(ア)のDNAを含む検体としては、例えば、患者の咽頭部綿棒擦過材料等から核酸を抽出したものがある。

工程(ア)のDNAポリメラーゼとしては例えばタック(Taq)ポリメラーゼを使用することができる。タックポリメラーゼは東洋紡(株)から購入できる。工程(ア)の加熱は例えば90℃～100℃で0.5～10分間静置する。

工程(イ)の冷却は例えば45℃～65℃で0.5～5分間静置し、保温は例えば70℃～80℃で1～10分間静置し、加熱は例えば90℃～100℃で0.5～5分間静置する。

工程(ア)の加熱操作や工程(イ)の冷却、保温及び加熱の操作は、DNAサーマルサイクラー(DNA thermal cycler)(登録商標)(パーキン・エルマー シータス(Perkin-elmer Cetus)製)を使用して行うことができる。

工程（ウ）の繰返し回数は特に限定されないが、30回程度繰返す。

工程（エ）の反応液に含まれるDNAを検出・測定するには、例えば、反応液を臭化エチジウム含有アガロースゲルを用いて電気泳動して反応液に含まれているDNAを分子量で分離し、紫外線を照射する。使用した本発明のプライマーが標識物で標識されている場合はその標識を利用してDNAを検出・測定する。

なお、一度工程（ア）～工程（ウ）を行った後、添加する本発明のプライマーを別の塩基配列のものにし、再度工程（ア）～工程（ウ）を行ってから工程（エ）に入ってもよい。

クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用試薬

本発明のクラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用試薬としては、例えば、本発明のプロブ又はプライマーを含む水溶液が凍結された状態でプラスチック製の容器に納められているものがある。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれにより何ら制限されるものではない。

以下、クラミジア・ニューモニエの宿主細胞の培養から、クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチドの遺伝子DNA配列／アミノ酸配列の決定まで、順を追って説明する。

実施例1 クラミジア・ニューモニエ特異的53K抗原ポリペプチドをコードするDNAの作製

(A) 宿主細胞(HL細胞)の培養

予め、プラスチック製培養フラスコ(75cm²)の底面いっぱいに増殖させたHL細胞をリン酸緩衝化生理食塩液(以下、PBSという。)マグネシウム不含(-)液5mlで洗浄し、0.1%(w/v)トリプシンを含むPBSを5ml加えて細胞表面全体に行き渡らせ、その液を捨てた後、37℃で10分間保温し、10%(v/v)牛胎児血清を含むダルベッコMEM培地5mlを加え、ピペッティングによりHL細胞を剥離して、細胞浮遊液を調製した。

75cm²のプラスチック製培養フラスコで培養するときは、培養フラスコに上記細胞浮遊液1ml及び10%(v/v)牛胎児血清含有ダルベッコMEM培地15~20mlを加え、また、6ウェルプラスチック製培養容器で培養するときは、上記細胞浮遊液8mlと10%牛胎児血清含有ダルベッコMEM培地292mlとの混合液4mlずつを各ウェルに加え、5%(v/v)炭酸ガス雰囲気下で培養した。

(B) クラミジア・ニューモニエYK41の培養

6ウェルプラスチック製培養容器(底面上)に増殖したHL細胞の培養上清をピペットで取り除き、これにクラミジア・ニューモニエYK41株の浮遊液(Kanamoto et al., Microbiol. Immunol., Vol. 37, p.495-498, 1993)〔クラミジア・ニューモニエYK41保存液を、1リットルあたり蔗糖75g、リン酸一カリウム0.52g、リン酸二カリウム1.22g及びグルタミン酸0.72gを含む水溶液(以下、SPGという。)で12ないし24倍に希釈し、超音波で1分間処理し、2,000rpmで3分間遠心分離した上清)を1ウェルあたり2ml

加えて、2,000 rpmで1時間遠心吸着を行った。遠心吸着後、クラミジア・ニューモニエ浮遊液を除き、1 μ g/mlシクロヘキシミド及び10% (v/v) 牛胎児血清を含むダルベッコMEM培地をウェルあたり4 ml加え、5% (v/v) 炭酸ガス雰囲気下、36℃で3日間培養した。培養後、滅菌したシリコン片で細胞を剥離し、細胞を回収した。これを8,000 rpmで30分間遠心分離して、沈殿をSPGに再懸濁し、-70℃で保存した。

(C) クラミジア・ニューモニエYK 41の基本小体の精製

-70℃に保存しておいたクラミジア・ニューモニエYK 41感染凍結HL細胞浮遊液を融解し、テフロンホモジナイザーでホモジナイズした。2,500 rpmで10分間遠心分離し、上清を回収した。沈殿は再びSPGに懸濁し、同様の操作を行い、上清を回収した。同様の操作を更に2回行い、得られた上清は集めて合わせた。

別途、遠心管に50% (w/v) 蔗糖を含む0.03 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、次いで、ウログラフィン76% (シェーリング社製) 3容量と0.03 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 7容量との混合液を重層し、この上に先に回収した上清を注意深く重層し、8,000 rpmで1時間遠心分離した。50% (w/v) 蔗糖を含む0.03 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 層及び沈殿を回収し、この回収液に同容量のSPGを加え、10,000 rpmで30分間遠心分離した。上清を捨て、沈殿をSPGに懸濁した。遠心分離管に、ウログラフィン76% (シェーリング社製) と0.03 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) の35%から50% (総量に対する前者の容量比) までの連続密度勾配液を作製し、この上に懸濁液を重層し、8000 rpmで1時間遠心分離した。黄色味があった白いバンドを少量摂取し、電子顕微鏡で観察した結果、クラミジア・ニューモニエの基本小体が含まれていた。そこでそのバンドを回収し、これをSPGで2倍に希釈し、10000 rpmで30分間遠心分離した。得られた沈殿をSPGに懸濁し、タンパク質濃度を測定 (バイオラッド社のタンパク測定キットを用い、牛血清アルブミンを標準とした) 後、-70℃で保存した。

(D) クラミジア・ニューモニエYK-41株のゲノムDNAの調製

上記精製クラミジア・ニューモニエYK-41株の基本小体の懸濁液300 μ l (タンパク質濃度: 1.37mg/ml) を4℃、12,000rpmで5分間遠心分離した。沈殿に1mMEDTAを含む10mMトリス-塩酸緩衝液pH8.0 (以下、TE緩衝液という) 500 μ lを加えて懸濁した。同様の遠心分離を再度行い、沈殿を300 μ lのTE緩衝液に懸濁した。1%SDS水溶液30 μ l及び1mg/mlプロテイナーゼK水溶液30 μ lを加え、56℃で30分間インキュベートし、基本小体を溶解させた。0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)飽和フェノール350 μ lを加え、ボルテックスミキサーでよく混合後、4℃、12,000rpmで5分間遠心分離し、水層を回収した(DNAの抽出)。この抽出操作はもう一度繰り返した。10mg/mlのRNase溶液を2 μ l加え、37℃で2時間インキュベートし、RNAを分解した。0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)飽和フェノール、クロロホルム及びイソアミルアルコールの25:24:1(容量比)の混合液(以下、PCIという。)300 μ lを加え、ボルテックスミキサーでよく混合し、4℃、12,000rpmで5分間遠心分離し、水層を回収した。この操作を合計5回繰り返した。

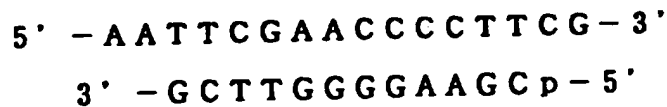
得られた液にその1/10容の10M酢酸アンモニウム水溶液及び2容のエタノールを加え、5分間放置し、DNAを析出させたのち、4℃、12,000rpmで5分間遠心分離した。沈殿は70%エタノール水溶液600 μ lを加え、混合し、4℃、12,000rpmで5分間遠心分離する洗浄を2回繰り返した。遠沈管のふたを開けたまま15分間放置して沈殿を乾燥させ、これにTE200 μ lを加えて溶かし、-20℃に保存した。

(E) ゲノムDNA発現ライブラリーの作製

ゲノムDNA溶液100 μ lに、制限酵素用M-buffer10 μ l、制限酵素混合液(AccI、HaeIII及び1/50希釈のAluI各0.4 μ lとTE20 μ lを混合)10 μ lを加え、37℃で20分間反応させた。なお、上記20分の反応時間は、DNAが1kbp~7kbpの大きさの部分消化DNAに分解される時間で、予め少量のゲノムDNAを用いて試験した。上記反応液にPCIを

100 μ l 加え、ボルテックスミキサーでよく混ぜ、4℃、12,000 rpmで5分間遠心分離し、水層を回収した。これに3M酢酸ナトリウム水溶液10 μ l 及びエタノール220 μ l を加え、-80℃に15分間静置し、部分消化DNAを析出させた。4℃、12,000 rpmで5分間遠心分離し、上清液を捨てたのち、沈殿に70%エタノール水溶液500 μ l を加えて混ぜ、再び、12,000 rpmで5分間遠心分離した。上清液を捨て、沈殿を減圧下に乾燥した。

得られた部分消化DNAを精製水20 μ l に溶かし、その19 μ l をとり、これに下記塩基配列で示されるリンカー (20 pmole/ μ l) 14 μ l、10 mM ATP 4.5 μ l、50 mM MgCl₂、50 mM ジチオスレイトール及び500 μ g/ml 牛血清アルブミン含有0.2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6、以下、10倍濃度ライゲーション用緩衝液という) 4.5 μ l、精製水2 μ l 及びT4 リガーゼ1 μ l を加え、16℃で4時間反応させ、リンカーを付加させた。



リンカーを付加させた部分消化DNAを、0.1 M NaCl 及び1 mM EDTA 含有10 mM トリス-塩酸緩衝液を移動相とするChromaspin 6000カラムにかけた。溶出液2滴ずつを分取し、各分画の一部を0.8%アガロースゲル電気泳動で分析して、1 kbp から7 kbp のDNA断片を含む分画を回収した。得られた分画144 μ l に、精製水13 μ l、10 mM ATP 20 μ l、0.1 M MgCl₂、50 mM ジチオスレイトール、1 mM スペルミジン塩酸塩及び1 mM EDTA 含有0.5 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6、以下、10倍濃度リン酸化反応用緩衝液という。) 20 μ l、及びT4 ポリヌクレオチドキナーゼ3 μ l を加え、37℃で30分間反応させ、DNA断片の5' 端をリン酸化した。PC1200 μ l を加えてよく振り混ぜた後、4℃、12,000 rpmで5分間遠心分離し、水層を回収した。20 mg/ml グリコーゲン水溶液1 μ l、3 M 酢酸ナトリウム水溶液20 μ l 及びエタノール400 μ l を加えてヌクレオチドを析出させた。4℃、12,000 rpmで10分間遠心分離し、上清を捨て、沈殿に70

%エタノール200 μ lを加え混ぜ、再び遠心分離し、上清を捨て、沈殿を風乾し、精製水1 μ lを加え溶かした。

この液0.6 μ lに、予め制限酵素EcoRIで切断した λ gt11DNA(1 μ g/ μ l、ストラタジーン(Stratagene)社)1 μ l、10倍濃度ライゲーション用緩衝液0.5 μ l、10mMATP0.5 μ l、T4リガーゼ0.4 μ l及び精製水2 μ lを加え、4℃で一晩反応させた。次いで、ギガパック(Gigapack)II Goldパッケージングキット(ストラタジーン社)を用い、得られた組換え λ gt11DNAをパッケージングした。

(F) クラミジア・ニューモニエ特異的モノクローナル抗体の作製

骨髓腫細胞株の培養及び継代

モノクローナル抗体の作製に用いた骨髓腫細胞株は、P3/NS1/1-Ag4-1(ATCC TIB-18)である。10%(v/v)牛胎児血清を含むRPMI1640培地で培養し、継代した。細胞融合に供する2週間前に、0.13mMの8-アザグアニン、0.5 μ g/mlのMC-210(マイコプラズマ除去剤、大日本製薬(株)製)及び10%(v/v)牛胎児血清を含むRPMI1640培地で1週間培養し、その後の1週間は通常の培地で培養した。

マウスの免疫

タンパク質の濃度が270 μ g/mlの上記基本小体の懸濁液200 μ lを、12000rpmで10分間遠心分離し、沈殿に200 μ lのPBSを加え、再懸濁した。これに200 μ lのフロイントコンプリータジュバントを加え、エマルジョンとし、その150 μ lをマウスの背中の皮下に注射した(この日を0日目とする)。14日目、34日目及び49日目に、タンパク質の濃度が270 μ g/mlの精製基本小体の懸濁液100 μ lをマウスの腹腔内に注射した。更に、69日目にタンパク質の濃度が800 μ g/mlの精製基本小体の懸濁液50 μ l、92日目に同懸濁液100 μ lをマウスの腹腔内に注射し、95日目に脾臓を取りだし、細胞融合に供した。

細胞融合

免疫したマウスの脾臓から得られた脾細胞108個に対して骨髓腫細胞107個を丸底ガラスチューブにとり、よく混合し、1400rpmで5分間遠心分離し、上清を除去した後、細胞を更によく混合した。予め37℃に保温しておいた30% (w/v) ポリエチレングリコールを含むRPMI 1640培地0.4mlを加え、30秒間放置した。700rpmで6分間遠心分離した後、RPMI 1640培地10mlを加え、ポリエチレングリコールがよく混ざるようにガラスチューブをゆっくり回転させ、1400rpmで5分間遠心分離し、上清を完全に除去し、沈殿に5mlのHAT培地を加え、5分間放置した。更に10~20mlのHAT培地を加え、30分間放置した後、骨髓腫細胞濃度が 3.3×10^5 /mlとなるようにHAT培地を加えて細胞を懸濁させ、パスツールピペットを用い96ウェルプラスチック製培養容器のウェルに2滴ずつ分注した。5% (v/v) 炭酸ガス雰囲気下、36℃で培養し、1日後、7日後及び14日後にウェルにHAT培地を1~2滴加えた。

抗体生産細胞のスクリーニング

精製したクラミジアニューモニエYK41の基本小体を1% (w/v) SDSで可溶化し、0.02%アジ化ソーダ含有0.05M重炭酸ソーダ緩衝液 (pH 9.6) に対して透析したのち、タンパク質濃度が1~10 μ g/mlとなるように希釈した液を、塩化ビニル製96ウェルEIA用プレートのウェルに50 μ lとり、4℃で一晩放置し、抗原を吸着させた。上澄みを除去し、ウェルに0.02% (w/v) ツィーン20を含むPBS 150 μ lを加え、3分間放置し、その後除去・洗浄した。洗浄操作を更に1回行なった後、ウェルに1% (v/v) 牛血清アルブミンを含むPBS 100 μ lを加え、4℃で一晩以上放置し、ブロッキングを行なった。牛血清アルブミンを含むPBSを除いた後、0.02% (w/v) ツィーン20を含むPBSで同様に2回洗浄後、ウェルに融合細胞の培養上清を50 μ l加え、室温で2時間放置した。0.02% (w/v) ツィーン20を含むPBSで同様に3回洗浄後、ウェルに25ng/mlのペルオキ

シダーゼ標識化ヤギ抗マウスIgG抗体を50 μ l加え、室温で2時間放置した。0.02% (w/v) ツィーン20を含むPBSで同様に3回洗浄後、ウェルにABTS溶液 (KPL社製) を50 μ l加え、室温で15分～1時間放置して発色反応させた後、96ウェルEIAプレート用光度計で405nmの吸光度を測定した。

この結果、陽性のウェルが見出され、その培養上清中には基本小体と反応する抗体が含まれていることが分かった。このウェル中の細胞をそれぞれパスツールピペットで回収し、24ウェルプラスチック製培養容器に移し、HAT培地1～2mlを加え、同様に培養した。

限界希釈法によるクローニング

24ウェルプラスチック製培養容器で増殖させた融合細胞の細胞濃度を測定し、細胞数が20個/mlとなるようそれぞれをHT培地で希釈した。別にHT培地に懸濁した4～6週齢のマウス胸腺細胞を96ウェルプラスチック製培養容器に2×105個/ウェルとり、これに上記の融合細胞 (細胞濃度が20個/ml) を50 μ l/ウェルずつ加え、5% (v/v) 炭酸ガス雰囲気下、36℃で培養し、その1日後、7日後及び14日後にHT培地を1～2滴/ウェル加えた。細胞の増殖が見られたウェルの培養上清を50 μ l回収し、上記と同様の方法で抗体の生産を確認した。

ウェル中に単一の細胞コロニーしか存在せず、基本小体と反応する抗体を生産するもので、かつ増殖が早い細胞をウェルから回収し、引き続き24ウェルプラスチック製培養容器で増殖させた。更に、同様のクローニング操作を繰り返し、最終的にハイブリドーマ、AY6E2E8を得た。

モノクローナル抗体の生産

ハイブリドーマAY6E2E8を、10% (v/v) 牛胎児血清含有RPMI 1640培地20mlを入れた75cm²プラスチック製細胞培養用フラスコで増殖させ、3～4日ごとにその培養液から16～18mlを抜き取り、代わりに新鮮な10% (v/v) 牛胎児血清含有RPMI 1640培地を総量で20mlと

なるように補い、継代培養を続けた。抜き取って回収した細胞培養液は、1200 rpmで5分間遠心分離し、上清（モノクローナル抗体含有培養上清）を回収した。

また、予め2週間前にプリスタン0.5 mlを腹腔内に注射しておいたBalb/cマウスのその腹腔内に、 $1 \sim 5 \times 10^6$ 個/mlとなるようPBSで懸濁したハイブリドーマ株を1 ml注射した。3週間後、balb/cマウスの腹水を回収し、1200 rpmで5分間遠心分離し、上清（モノクローナル抗体含有腹水）を回収した。

モノクローナル抗体のサブクラスの同定

ISOTYPE Ab-STAT (SangStat Medical社製)を用い、モノクローナル抗体のサブクラスを同定した。その結果、ハイブリドーマAY6E2E8が生産するモノクローナル抗体のサブクラスはIgG2bであった。

モノクローナル抗体の精製

ハイブリドーマAY6E2E8が生産するモノクローナル抗体は以下のようにして精製した。ハイブリドーマAY6E2E8をマウス腹腔内に注射して得られたモノクローナル抗体含有腹水1容に3容のPBSを加えて混合し、3000 rpmで10分間遠心分離し、その上清をボアサイズ0.22 μ mのフィルタで濾過後、これをクロマトップスーパープロテインAカラム（径4.6 mm \times 100 mm、日本ガイシ(株)製）を用いるHPLCで精製した。カラムは予め、PBSで平衡化しておいた。

0.22 μ mフィルタで濾過後のサンプル1 mlをカラムに注入後、PBSを1 ml/minで3分間流し、次いで、5 ml/minで4分間流してカラムを洗浄した後、精製水1 LにNaCl 8.77 g、クエン酸（一水和物）16.7 g及びNa₂HPO₄ \cdot 12H₂O 14.72 gを溶かした液を2 ml/minで5分間流してモノクローナル抗体を溶出した。モノクローナル抗体の溶出画分を集め、TTBS溶液で希釈した。

クラミジア・ニューモニエの基本小体を溶解し、基本小体に含有されているベ

プチドを取得した。このペプチドと上記モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行い、取得したモノクローナル抗体の特異性を調べた。

その結果、取得したモノクローナル抗体はクラミジア・ニューモニエ 53 KDa 抗原ポリペプチドを認識することがわかった。

ハイブリドーマ AY 6 E 2 E 8 と同様にして、ハイブリドーマ 70 を取得した。上記の方法と同様にしてハイブリドーマ 70 が産生するモノクローナル抗体の特異性を調べた結果、このモノクローナル抗体はクラミジア・ニューモニエ 73 KDa 抗原ポリペプチドを認識することがわかった。

また、上記の方法と同様にしてハイブリドーマ 70 が産生するモノクローナル抗体のサブクラスを調べた結果、この抗体のサブクラスは IgG であった。

(G) 抗原ポリペプチドをコードする DNA のクローニング

大腸菌 Y1090 r- 株の一白金耳を 10 mM MgSO₄ 3 ml、0.2% マルトース及び 50 µg/ml アンピシリン含有の LB (水 1 L 中に NaCl 5 g、ポリペプトン 10 g 及び酵母エキス 5 g を含む) 培地に接種し、37℃で一晩振とう培養したのち、これを 2,000 rpm で 10 分間遠心分離した。沈殿 (大腸菌) に 10 mM MgSO₄ 水溶液 9 ml を加えて混ぜ、この大腸菌懸濁液の 0.35 ml を採り、これに λgt11 (DNA ライブラリー) 懸濁液を 0.1~10 µl 加え、37℃で 20 分間インキューベートし、大腸菌に λgt11 を感染させた。予め 47℃に保温した液状 LB 寒天培地 2.5 ml に、上記 λgt11 感染大腸菌を加え、これを直ちに LB 寒天培地上に撒いた。上層寒天培地が固化した後、42℃で 3~4 時間培養し、プラークが観察された時点で 10 mM IPTG 水溶液に浸漬したニトロセルロースフィルター (φ 82 mm) を上層寒天培地に乗せ、37℃で 12 時間培養した。黒インクをつけた注射針で非対称に 3 ヶ所突き刺してフィルターに目印をつけた後、フィルターを寒天培地からとり出し、150 mM NaCl 及び 0.1% ツィーン 20 含有 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) (以下、TTBS 緩衝液という) で 3 回洗浄した。寒天培地は冷蔵庫中に保存した。

フィルターを 150 mM NaCl 含有 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) (以下、TBS 緩衝液という) の 0.1% 牛血清アルブミン含有液に浸し、

37℃で1時間振とうし、ブロッキング反応を行った。次いで、フィルターをTBS緩衝液で2回洗浄したのち、10 µg/mlのクラミジア・ニューモニエ特異的モノクローナル抗体TBS溶液に浸し、37℃、1時間振とうした。フィルターをTBS緩衝液で3回洗浄した後、パーオキシダーゼ標識の(50 ng/ml)抗マウスIgG抗体溶液(TBS緩衝液)中、37℃で1時間振とうした。フィルターをTBS緩衝液で3回、及びTBS緩衝液で3回洗浄した後、発色基質液(TBS緩衝液100 mlに30%過酸化水素水溶液60 µlと0.3%4-クロロ-1-ナフトールのメタノール溶液20 mlを加えて調製)に浸漬し、室温で約30分間放置した。十分発色した時点でフィルターをとり出し、精製水で洗浄し、風乾した。

フィルターの発色スポットに対応する寒天培地上のブラークを捜して同定し、この部分の寒天をパスツールピペットでつき刺し、ブラークを回収した。回収したブラークはクロロホルム1滴を加えた0.1 M NaCl、8 mM硫酸マグネシウム及び0.01%ゼラチン含有50 mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)(以下、SM緩衝液という)中に採り、4℃で一晩放置しブラーク中のλファージを抽出した。ブラークが全て上記モノクローナル抗体と反応するようになるまで、前記操作を繰り返し、抗原ポリペプチドをコードするDNAをクローン化した。

このようにして、クラミジア・ニューモニエ特異的モノクローナル抗体反応性のクラミジア・ニューモニエ特異的抗原ポリペプチドを発現するλファージが得られ、これを53-3S λファージと命名した。

(H) 53-3S λファージの培養とDNA精製

前記(F)で述べた方法と同様にしてブラークを形成させ、一つのブラークを回収し、100 µlのSM緩衝液に入れ、4℃で一晩放置しλファージを抽出した。LB培養液で一晩培養した大腸菌Y1090 r-株250 µlに、λファージ液5~10 µlを加え、37℃で20分間放置し、大腸菌にλファージを感染させた。予め37℃に温めておいた10 mM硫酸マグネシウムを含むLB培地50 mlに接種し、λファージによる大腸菌の溶菌が起こるまで37℃で5~7時

間振とう培養した。250 μ l のクロロホルムを加え、3,000 rpm で10分間遠心分離し大腸菌細胞残渣を除き、 λ ファージ懸濁液を得た。 λ ファージDNAは、Wizard λ prepsキット（プロメガ社）を用いて精製した。

(I) クラミジア・ニューモニエ抗原ポリペプチドをコードするDNAの増幅

600 μ l 用のマイクロチューブに、精製水61.5 μ l、10倍濃度 反応用緩衝液（500 mM KCl、15 mM MgCl₂、0.01%ゼラチンを含むトリス-塩酸緩衝液pH8.3）10 μ l、20 mM dNTP 1 μ l、53-3 S λ ファージDNA溶液0.1 μ l、20 nM λ gt11 forward primer（宝酒造株式会社）1 μ l、20 nM λ gt11 reverse primer（宝酒造株式会社）1 μ l、AmpliTaq DNA Polymerase 0.5 μ lを入れ、ミネラルオイルを2～3滴重層した。94℃ 30秒、55℃ 30秒、73℃ 2分のサイクルのインキュベーションを30回繰返し、DNAを増幅した。反応後、1.2% 低温融解アガロースゲル電気泳動を行い、増幅されたDNAを切り出して Wizard PCR Prepキット（プロメガ社）で精製した。

(J) DNA塩基配列分析

DNA塩基配列分析は、PCRで増幅したDNAを鋳型として、Taq DNA ポリメラーゼを用いた蛍光標識ターミネータサイクルシーケンス法でシーケンス反応を行い、373A型DNAシーケンサ（アプライドバイオシステムズ社）で分析を行った。得られたDNA塩基配列を遺伝子配列分析ソフト「DNASIS」（日立ソフトウェアエンジニアリング社）を用いて、編集、連結、アミノ酸翻訳領域の推定を行ない、配列番号9の配列を得た。

配列番号9の配列の解析結果から、53 KDa 抗原ポリペプチドについて、そのN末端からC末端に向けて約60%のアミノ酸配列が解明されたことが分かった。

上記クラミジア・ニューモニエ抗原ポリペプチドをコードするDNAは、クラミジア・ニューモニエに特異的で、かつ、53 KDa 抗原ポリペプチドを認識するモノクローナル抗体を利用してクローニングされたので、このDNAは、明ら

かに 53 KDa 抗原ポリペプチドをコードしている。

配列番号 9 の塩基配列及びアミノ酸配列の相同性検索を GenBank データベースで行なった結果、高い相同性を示す既知の配列は無かった。

実施例 2 クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチドの一部を含むポリペプチドをコードする DNA を含む組換えベクターの作製、及びそれを含む形質転換体の作製

前述したように、取得した DNA が 53 KDa 抗原ポリペプチドをコードしていることが明らかであるが、念のため、下記のようにして、取得した DNA を発現させ、上記抗体と反応するか否か調べた。

プラスミド pBBK10MM を制限酵素 BamHI と XhoI で切断し、1.2% 低温融解アガロースゲル電気泳動を行い、約 4.6 Kbp の DNA 断片を切り出して精製した。この DNA 断片 100ng に、配列番号 11 及び配列番号 12 の合成 DNA 各 1ng を添加し、DNA ライゲーションキット（宝酒造）を用いてこれらの DNA を連結した。この反応物を大腸菌 HB101 株コンピテントセル（宝酒造）に入れ、形質転換体を作製し、プラスミドを取得し、これを pADA431 と名付けた。このプラスミドを制限酵素 MunI で切断した後、アルカリホスファターゼ処理し 5' リン酸基を除去した。

一方、53-3Sλファージ DNA を制限酵素 EcoRI で切断し、この DNA 断片 50ng に、上記の制限酵素 MunI で切断した pADA431 プラスミド DNA 100ng を添加し、同様に連結し、形質転換体を作製し、53-3Sλファージ DNA の制限酵素 EcoRI 断片が組み込まれたプラスミドを取得し、これを pCPN533α と名付けた。このプラスミドは、配列番号 10 の塩基配列を有する約 5.7 kbp の DNA であり、53K 抗原ポリペプチドの一部を含むポリペプチドを宿主大腸菌で発現させることができるものである。この 53K 抗原ポリペプチドの一部を含むポリペプチドをコードする DNA の塩基配列は配列番号 4 のようになっており、この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は配列番号 2 のようになっていた。プラスミド pCPN533α をもつ大腸菌を同様に培養

し、電気泳動、ニトロセルロース膜への転写、モノクローナル抗体での検出を同様に行った結果、上記ポリペプチドに相当する発色したバンドが観察され、プラスミド pCPN 533 α をもつ大腸菌が、クラミジア・ニューモニエに特異的に反応するモノクローナル抗体と反応することができる 53 K 抗原ポリペプチドを発現していることが示された。

実施例 3 クラミジア・ニューモニエの 53 KDa 抗原ポリペプチド全体をコードする DNA の取得

配列番号 9 の塩基配列を元に、配列番号 26 及び 27 の塩基配列を有する DNA を、DNA 合成機を用いて合成した。

実施例 1 で得たクラミジア・ニューモニエ YK 41 株のゲノム DNA の水溶液 10 μ l (DNA 含有量: 約 1 μ g) に、10 倍濃縮 K バッファ 5 μ l、精製水 35 μ l 及び制限酵素 Hind III (19 U/ μ l) 5 μ l を添加し、37℃ で 3 時間保温した。

得られた反応液をフェノールで抽出し、エタノールを添加し、遠心分離して沈殿を取得した。この沈殿に、PCR in vitro Cloning Kit (宝酒造(株)製品名) 中の Hind III カセット DNA (20 ng/ μ l) 5 μ l、ライゲーション溶液 15 μ l を添加し、16℃ で 30 分間保温した。

取得した反応液をフェノールで抽出し、エタノールを添加し、遠心分離して沈殿を取得し、これを 10 μ l の精製水に溶解した。

得られた溶液 1 μ l に、精製水 78.5 μ l、10 倍濃縮 PCR 用 バッファ 10 μ l、2.5 mM dNTP 8 μ l 及び Taq ポリメラーゼ 0.5 μ l (5 U/ μ l) を添加し、さらに、プライマー DNA として、配列番号 26 の塩基配列を有する DNA (20 pmol/ μ l) 1 μ l 及び配列番号 28 の塩基配列を有する DNA (20 pmol/ μ l) (上記キットにおいて、プライマー C1 として同封されていたもの) 1 μ l を添加して、これらを 0.6 ml のマイクロチューブに入れ、ミネラルオイル 2 滴を重層し、94℃ 30 秒、55℃ 2 分、72℃ 3 分の温度サイクルを 30 回繰り返した。以上の工程を PCR 工程という。

PCR工程後の反応液 $1\mu\text{l}$ に、プライマーDNAとして、配列番号27の塩基配列を有するDNA($20\text{pmol}/\mu\text{l}$) $1\mu\text{l}$ 及び配列番号29の塩基配列を有するDNA($20\text{pmol}/\mu\text{l}$) (上記キットにおいて、プライマーC2として同封されていたもの) $1\mu\text{l}$ を用い、再度PCR工程を行った。

2番目のPCR工程後の反応液を1. 2%低融点アガロースゲル電気泳動させ、約1.4kbpの大きさのDNAが含有されているアガロースゲルを切り出した。DNAの精製には Wizard PCR Prepキット (プロメガ社) を用いた。即ち、切り出したアガロースゲルにキットに同封されている緩衝液を添加し、加熱してアガロースゲルを溶解し、キットに同封されている精製用樹脂を添加してDNAを樹脂に吸着させ、遠心分離して精製用樹脂を沈殿として取得した。沈殿をプロパノールで洗浄し、再度遠心分離して沈殿を取得した。沈殿に精製水を添加し、精製用樹脂からDNAを溶出して、遠心分離し、上清(DNA水溶液)を得た。以上の工程をDNA精製工程という。

取得したDNA水溶液を用い、含まれるDNAを鋳型とするTaq DNAポリメラーゼを用いた蛍光標識ターミネータサイクルシーケンス法でシーケンス反応を行い、373A型DNAシーケンサ(アプライドバイオシステムズ社)でそのDNAの塩基配列を分析した。得られたDNA塩基配列を遺伝子配列分析ソフト「DNASIS」(日立ソフトウェアエンジニアリング社)を用いて、編集、連結、アミノ酸翻訳領域の推定を行なった。以上の工程を塩基配列解析工程という。

取得したDNAの塩基配列を解析した結果、このDNAは実施例1で取得したクラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチドをコードするDNAの中の3'末端側の約50bpの塩基配列を有していた。さらに、その塩基配列の下流には、終始コドンを含む約0.7kbのコード領域が存在していることがわかった。

配列番号9の塩基配列を元に、クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチドのをコードするDNAの上流部分に相当するプライマーとして、配列番号30の塩基配列を有するDNAを、また、上記の約0.7kbのコード領域を含む塩基配列を元に、クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチドのをコードするDNAの下流部分に相当するプライマーとして、配列番号31の塩基配列を有するD

NAを、それぞれ、DNA合成機を用いて合成した。

実施例1で得たクラミジア・ニューモニエYK41株のゲノムDNAの水溶液1 μ lを用い、プライマーDNAとして配列番号30の塩基配列を有するDNA(20 pmol/ μ l)1 μ l及び配列番号31の塩基配列を有するDNA(20 pmol/ μ l)1 μ lを用いてPCR工程を行った。

3番目のPCR工程後の反応液を用い、上記DNA精製工程を行い、約1.5 kbpのDNAを取得した。

取得したDNA水溶液を用い、上記塩基配列解析工程を行った。

取得したDNAの塩基配列を解析した結果、このDNAは配列番号3の塩基配列を有しており、配列番号1のアミノ酸配列をコードしていることがわかった。

また、プラスミドpCPN533 α と前述の λ gt11のDNAライブラリーを用いてゲノムウォーキングを行い、クラミジア・ニューモニエの53 KDa抗原ポリペプチド全体をコードするDNAの取得した。

実施例4 クラミジア・ニューモニエの53 KDa抗原ポリペプチド全体をコードするDNAを含む組換えベクターの作製、及びそれを含む形質転換体の作製

クラミジア・ニューモニエ53 KDa抗原ポリペプチド全体をコードするDNAを含む組換えベクター及びそれを含む形質転換体は、以下のようにして作製することができる。

クラミジア・ニューモニエの53 KDa抗原ポリペプチド全体をコードするDNAを用い、実施例2と同様にしてクラミジア・ニューモニエの53 KDa抗原ポリペプチド全体をコードするDNAを含む組換えベクターとそれを含む形質転換体を作製する。

実施例5 クラミジア・ニューモニエの73 KDa抗原ポリペプチドをコードするDNAの作製

ハイブリドーマAY6E2E8を得る方法と同様にして、ハイブリドーマ70

を取得した。ハイブリドーマ70を利用してマウスの腹水を取得し、その上清に含まれているモノクローナル抗体の性質を解析した結果、このモノクローナル抗体は、クラミジア・ニューモニエの73 KDaの抗原ポリペプチドに特異的であることがわかった。

モノクローナル抗体AY6E2E8の代わりに、モノクローナル抗体70を使用し、実施例1と同様の手順で操作した。クローン70-2S λ ファージが得られ、これから配列番号13の配列が得られた。

配列番号13の配列の解析結果から、クラミジア・ニューモニエの73 K抗原タンパク質については、そのN末端からC末端に向けて約90%のアミノ酸配列が解明されたことが分かった。

配列番号13の塩基配列及びアミノ酸配列の相同性検索をGenBankデータベースで行なった結果、これはクラミジア・トラコマチスから単離された遺伝子塩基配列(L.M.Sardinia et al: J. Bacteriol., Vol.171, 335-341(1989))と高い相同性を示すものであった。

実施例6 クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチドを抗原として用いる、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の製造

抗クラミジア・ニューモニエ抗体は、クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチドを用い、次のようにして製造することができる。

(A) 骨髓腫細胞株の培養及び継代

骨髓腫細胞株はP3X63Ag8.653(ATCC CRL-1580)を10%(v/v)牛胎児血清を含むRPMI1640培地で培養し、継代する。細胞融合に供する2週間前に、0.13mMの8-アザグアニン、0.5 μ g/mlのMC-210(マイコプラズマ除去剤、大日本製薬(株)製)及び10%(v/v)牛胎児血清を含むRPMI1640培地で1週間培養し、その後の1週間は通常の培地で培養する。

(B) マウスの免疫

タンパク質の濃度が $270\text{ }\mu\text{g/ml}$ の上記抗原ポリペプチドの溶液 $200\text{ }\mu\text{l}$ に $200\text{ }\mu\text{l}$ のフロイントコンプリートアジュバントを加え、エマルジョンとし、その $150\text{ }\mu\text{l}$ をマウスの背中の皮下に注射する（この日を0日目とする）。14日目、34日目及び49日目に、タンパク質の濃度が $270\text{ }\mu\text{g/ml}$ の上記抗原ポリペプチドの懸濁液 $100\text{ }\mu\text{l}$ をマウスの腹腔内に注射し、更に、69日目にタンパク質の濃度が $800\text{ }\mu\text{g/ml}$ の上記抗原ポリペプチドの懸濁液 $50\text{ }\mu\text{l}$ 、92日目に同懸濁液 $100\text{ }\mu\text{l}$ をマウスの腹腔内に注射し、95日目に脾臓を取り出し、細胞融合に供する。

(C) 細胞融合

上記脾臓から得られる脾細胞108個に対して骨髓腫細胞107個を丸底ガラスチューブにとり、よく混合し、 1400 rpm で5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を更によく混合する。予め 37°C に保温してある30% (w/v) ポリエチレングリコールを含むRPMI 1640培地 0.4 ml を加え、30秒間放置する。 700 rpm で6分間遠心分離した後、RPMI 1640培地 10 ml を加え、ポリエチレングリコールがよく混ざるようにガラスチューブをゆっくり回転させ、 1400 rpm で5分間遠心分離し、上清を完全に除去し、沈殿に 5 ml のHAT培地を加え、5分間放置する。更に $10\sim 20\text{ ml}$ のHAT培地を加え、30分間放置し、骨髓腫細胞濃度が $3.3\times 10^5/\text{ml}$ となるようにHAT培地を加えて細胞を懸濁させ、パスツールピペットを用い96ウェルプラスチック製培養容器のウェルに2滴ずつ分注する。5% (v/v) 炭酸ガス雰囲気下、 36°C で培養し、1日後、7日後及び14日後にウェルにHAT培地を1～2滴加える。

(D) 抗体生産細胞のスクリーニング

上記抗原ポリペプチドをタンパク質濃度が $1\sim 10\text{ }\mu\text{g/ml}$ となるように0.02% (w/v) アジ化ソーダ含有0.05M重炭酸ソーダ緩衝液 (pH9.6) に懸濁し、0.02% アジ化ソーダ含有0.05M重炭酸ソーダ緩衝液 (pH9.6) に対して透析し、その後、タンパク質濃度が $1\sim 10\text{ }\mu\text{g/ml}$ となるように希釈した液を、塩化ビニル製96ウェルEIA用プレートのウェルに $50\text{ }\mu\text{l}$ とり、

4℃で一晩放置し、抗原を吸着させる。上澄みを除去し、ウェルに0.02% (w/v) ツィーン20を含むPBS 150 μ lを加え、3分間放置し、その後除去・洗浄する。洗浄操作を更に1回行なった後、ウェルに1% (v/v) 牛血清アルブミンを含むPBS 100 μ lを加え、4℃で一晩以上放置し、ブロッキングを行なう。牛血清アルブミンを含むPBSを除いた後、0.02% (w/v) ツィーン20を含むPBSで同様に2回洗浄後、ウェルに融合細胞の培養上清を50 μ l加え、室温で2時間放置する。0.02% (w/v) ツィーン20を含むPBSで同様に3回洗浄後、ウェルに25 ng/mlのペルオキシダーゼ標識化ヤギ抗マウスIgG抗体を50 μ l加え、室温で2時間放置する。0.02%

(w/v) ツィーン20を含むPBSで同様に3回洗浄後、ウェルにABTS溶液 (KPL社製) を50 μ l加え、室温で15分～1時間放置して発色反応させ、96ウェルEIAプレート用光度計で405 nmの吸光度を測定する。そして陽性のウェル中の細胞をそれぞれパスツールピペットで回収し、24ウェルプラスチック製培養容器に移し、HAT培地1～2 mlを加え、同様に培養する。

(E) 限界希釈法によるクローニング

24ウェルプラスチック製培養容器で増殖させた2株の融合細胞の細胞濃度を測定し、細胞数が20個/mlとなるようそれぞれをHT培地で希釈する。別にHT培地に懸濁した4～6週齢のマウス胸腺細胞を96ウェルプラスチック製培養容器に1～2 \times 10⁵個/ウェルとり、これに上記の融合細胞 (細胞濃度が20個/ml) を50 μ l/ウェルずつ加え、5% (v/v) 炭酸ガス雰囲気下、36℃で培養し、その1日後、7日後及び14日後にHT培地を1～2滴/ウェル加える。細胞の増殖が見られたウェルの培養上清を50 μ l回収し、上記(D)の「抗体生産細胞のスクリーニング」と同様の方法で抗体の生産を確認する。

ウェル中に単一の細胞コロニーしか存在せず、基本小体と反応する抗体を生産するもので、かつ増殖が早い細胞をウェルから回収し、引き続き24ウェルプラスチック製培養容器で増殖させる。更に、同様のクローニング操作を繰り返し、抗クラミジア・ニューモニエ抗体を生産するハイブリドーマを取得する。これを培養し、その培養上清から抗クラミジア・ニューモニエ抗体を製造する。

実施例 7 抗原ポリペプチドを抗原として用いる抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定

抗クラミジア・ニューモニエ抗体は、本発明の抗原ポリペプチドを抗原として用い、次のようにして検出・測定することができる。

抗原ポリペプチドとして、配列番号 1 のアミノ酸配列からなるポリペプチドを用い、これをマイクロタイタープレートに固定し、牛血清アルブミンを含む PBS を加え、4℃で一晩以上放置し、ブロッキングを行なう。牛血清アルブミンを含む PBS を除いた後、0.02% (w/v) ツィーン 20 を含む PBS で同様に 2 回洗浄後、ウェルに患者の血清を加え、室温で 2 時間放置する。0.02% (w/v) ツィーン 20 を含む PBS で同様に 3 回洗浄後、ウェルにパーオキシダーゼ標識化マウス抗ヒト IgG 抗体を加え、室温で 2 時間放置する。0.02% (w/v) ツィーン 20 を含む PBS で同様に 3 回洗浄後、ウェルに ABTS 溶液 (KPL 社製) を加え、室温で 15 分～1 時間放置して発色反応させ、96 ウェル EIA プレート用光度計で 405 nm の吸光度を測定する。

実施例 8 DHFR とクラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチドの一部を含むポリペプチドの融合タンパク質をコードする DNA を含む組換えベクターの作製、及びそれを含む形質転換体の作製

プラスミド pBBK10MM を制限酵素 BamHI と XhoI で切断し、1.2% 低温融解アガロースゲル電気泳動を行い、約 4.6 Kbp の DNA 断片を切り出して精製した。

一方、53-3 S λ ファージ DNA を制限酵素 EcoRI で切断し、同様に約 1.0 Kbp の DNA 断片を精製した後、さらに制限酵素 AvalI で切断し、同様に約 0.8 Kbp の DNA 断片を精製した。上記の約 4.6 Kbp の DNA 断片 100 ng に上記の約 0.8 Kbp の DNA 断片 100 ng、配列番号 21～24 の合成 DNA 各 1 ng を添加し、DNA ライゲーションキット (宝酒造) を用いてこれらの DNA を連

結した。この反応物を大腸菌HB101株コンピテントセル（宝酒造）に入れ、形質転換体を作製した。

この形質転換体を、50 mg/Lのアンピシリンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で24時間培養した。得られた大腸菌のコロニーを50 mg/Lのアンピシリンを含むLB培地3 mlに接種し、37℃で一晩振とう培養した。アルカリ溶解法でプラスミドベクターを分離し、制限酵素NruIで切断し、0.8%アガローズゲル電気泳動で分析し、616 bpと4822 bpのDNA断片が生じている組換えプラスミドベクターをもつ大腸菌を選択した。得られた組換えプラスミドベクターをpCPN533Tと名付けた。このプラスミドベクターは、配列番号25の塩基配列を有する約5.4 kbpのDNAであり、DHFRのC末端にクラミジア・ニューモニエの53 KDa抗原ポリペプチドの一部を含むポリペプチドを連結した融合タンパク質を発現させるものである。この融合タンパク質をコードするDNAの塩基配列は配列番号18のようになっており、この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は配列番号16のようになっていた。

実施例9 DHFRとクラミジア・ニューモニエの53 KDa抗原ポリペプチドの一部を含むポリペプチドの融合タンパク質の確認

プラスミドpCPN533Tを保持する大腸菌HB101株1白金耳を50 mg/lのアンピシリンを含むLB培地3 mlに接種し、37℃で一晩振とう培養した。この大腸菌を含む培地10 μ lに10 μ lのローディング緩衝液（0.01%プロモフェノールブルー、10%メルカプトエタノール、20%グリセロール、5% SDSを含む0.156 Mトリス塩酸緩衝液、pH6.8）を加え、80℃で5分間加熱した後、反応液を5-20%ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動にかけた。セミドライブロッティング装置の陽極板上に、10%メタノール、0.05%ドデシル硫酸ナトリウムを含む0.3 Mトリス水溶液で湿らせたろ紙1枚、10%メタノール、0.05%ドデシル硫酸ナトリウムを含む25 mMトリス水溶液で湿らせたろ紙1枚、10%メタノール、0.05%ドデシル硫酸ナトリウム、40 mMアミノカプロン酸を含む25 mMトリス水溶液で湿らせたニトロセルロース膜1枚、上記電気泳動の終了したポリアクリルアミドゲル、40

mMアミノカブロン酸を含む25mMトリス水溶液で湿らせたろ紙2枚をこの順序で重ね、陰極板をセットして2.5mA/cm²の電流密度で1時間電流を流し、ポリアクリルアミドゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜を0.1%牛血清アルブミンを含むTTBS緩衝液に入れ、室温で1時間以上放置し、ブロッキングした。ニトロセルロース膜をTTBS緩衝液で2回洗浄した後、ハイブリドーマSCP53が生産するモノクローナル抗体溶液(5~10μg/ml TTBS緩衝液中)中で37℃、1時間振とうした。ニトロセルロース膜をTTBS緩衝液で3回洗浄した後、パーオキシダーゼ標識した抗マウスIgG抗体溶液(50ng/ml TTBS緩衝液中)中で37℃1時間振とうした。ニトロセルロース膜をTTBS緩衝液で3回洗浄した後、発色基質液(100mlのTTBS緩衝液に60μlの30%過酸化水素水溶液と20mlの4-クロロ-1-ナフトールメタノール溶液を混合する)に入れ、室温で30分間反応させた。ニトロセルロース膜を取り出し、精製水で洗浄した後風乾した。この結果、融合タンパク質の大きさに相当する位置に発色したバンドが観察され、プラスミドpCPN533Tをもつ大腸菌が、クラミジア・ニューモニエ特異的に反応するモノクローナル抗体と反応することのできる53KDa抗原を含む融合タンパク質を発現していることが示された。

実施例10 クラミジア・ニューモニエの53KDa抗原ポリペプチド全体をコードするDNAの取得

実施例3で、クラミジア・ニューモニエの53KDa抗原ポリペプチド全体をコードするDNAを既に取得したが、別途、次のようにして、このDNAを取得した。

プラスミドpCPN533Tと前述のλgt11のDNAライブラリーを用いてゲノムウォーキングを行い、クラミジア・ニューモニエの53KDa抗原ポリペプチド全体をコードするDNAを取得した。このDNAの塩基配列を分析・解析した結果、このDNAは配列番号17の484~1947目の塩基配列を有しており、配列番号15の162~649番目のアミノ酸配列をコードしている

ことがわかった。

実施例 1 1 DHFRとクラミジア・ニューモニエの53KDa抗原ポリペプチド全体の融合タンパク質をコードするDNAを含む組換えベクターの作製、及びそれを含む形質転換体の作製

DHFRとクラミジア・ニューモニエの53KDa抗原ポリペプチド全体の融合タンパク質をコードするDNAを含む組換えベクターとそれを含む形質転換体は次のようにして作製することができる。

プラスミドpBBK10MMと前記クラミジア・ニューモニエの53KDa抗原ポリペプチド全体をコードするDNAを用い、実施例8と同様にしてDHFRとクラミジア・ニューモニエの53KDa抗原ポリペプチド全体の融合タンパク質をコードするDNAを含む組換えベクターとそれを含む形質転換体を作製する。この融合タンパク質をコードするDNAの塩基配列は配列番号17のようになり、この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は配列番号15のようになっている。

実施例 1 2 融合タンパク質を抗原として用いる、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の製造

抗クラミジア・ニューモニエ抗体は、本発明の融合タンパク質を抗原として用い、次のようにして製造することができる。

免疫に使用する抗原を上記融合タンパク質とする以外は、上記実施例6と同様にし、抗クラミジア・ニューモニエ抗体を産生するハイブリドーマを取得する。これを培養し、その培養上清から抗クラミジア・ニューモニエ抗体を製造する。

実施例 1 3 融合タンパク質を抗原として用いる抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定

抗クラミジア・ニューモニエ抗体は、本発明の融合タンパク質を抗原として用い、次のようにして検出・測定することができる。

融合タンパク質として、配列番号15のアミノ酸配列からなるポリペプチドを用い、これをマイクロタイタープレートに固定し、牛血清アルブミンを含むPBSを加え、4℃で一晩以上放置し、ブロッキングを行なう。牛血清アルブミンを含むPBSを除いた後、0.02% (w/v) ツィーン20を含むPBSで同様に2回洗浄後、ウェルに患者の血清を加え、室温で2時間放置する。0.02% (w/v) ツィーン20を含むPBSで同様に3回洗浄後、ウェルにパーオキシダーゼ標識化マウス抗ヒトIgG抗体を加え、室温で2時間放置する。0.02% (w/v) ツィーン20を含むPBSで同様に3回洗浄後、ウェルにABTS溶液 (KPL社製) を加え、室温で15分～1時間放置して発色反応させ、96ウェルEIAプレート用光度計で405nmの吸光度を測定する。

実施例14 PCR法によるクラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出

配列番号19の塩基配列からなるDNAと配列番号20の塩基配列からなるDNAをアプライドバイオシステムズ社製のDNA合成機で化学合成し、それぞれプライマー53F2、プライマー53R2と名付けた。

クラミジア・ニューモニエYK41株、またはクラミジア・トラコマチスL2株、又はクラミジア・シッタシBugd. 17-SL株を感染させた細胞を遠心分離で回収し、KCl 50mM、MgCl₂ 2.5mM、ゼラチン 0.1mg/ml、ノニデットP40 (Nonidet P40) 0.45% トゥイーン20 (Tween 20) 0.45%、プロテイナーズK 0.1mg/mlを含む5.0mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.3) 0.1mlを加え、56℃で1時間保温した後、95℃で10分間加熱してプロテイナーズKを失活させ、各クラミジアの遺伝子を含む試料とした。

各試料1μlに、精製水78.5μl、2.5mM dNTP水溶液8μl、500mM KCl及び15mM MgCl₂を含む100mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.3) 10μl、30μMの上記プライマー53F2及びプライマー53R2の水溶液各1μl、並びに5U/μl タックポリメラーゼ 0.5μ

1を添加し、ミネラルオイル50 μ lを重層した後、94℃30秒、60℃30秒、72℃60秒の加熱、冷却、保温のサイクルを30回繰り返した。

反応終了後、反応液2 μ lを取得し、アガロースゲル電気泳動を行い、ゲルを0.5 μ l/mlの臭化エチジウムに浸し、紫外線照射下でDNAのバンドを観察した。

その結果、クラミジア・ニューモニエYK41株から得た試料について、配列番号3の塩基配列のうち、プライマー53F2の塩基配列とプライマー53R2の塩基配列に相補的な塩基配列で挟まれた領域に相当する360bpの大きさのDNAのバンドが観察された。しかし、他の株から得た試料についてはバンドが観察されなかった。

産業上の利用可能性

配列番号1のポリペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸配列を含むポリペプチドAからなる本発明の抗原ポリペプチドは、クラミジア・ニューモニエの抗体検査等に利用できる。

ポリペプチドAが、配列番号1のポリペプチドからアミノ酸1～250個が欠落しているポリペプチドである本発明の抗原ポリペプチドは、アミノ酸配列の長さが短いため、担体等に固定化できる抗原ペプチドの数を多くすることができ、それにより、感度の高い診断薬の製造に利用できる。

ポリペプチドAが、配列番号1のポリペプチドの中のアミノ酸1～100個が他のアミノ酸で置換されているポリペプチドである本発明の抗原ポリペプチドは、タンパク質分解酵素による分解を受けにくい構造を作ることができるので、抗原として安定性に優れる。ポリペプチドAが、配列番号1のポリペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸配列にアミノ酸若しくは2～1000個のアミノ酸配列が結合したポリペプチドである本発明の抗原ポリペプチドは、アミノ酸若しくは2～1000個のアミノ酸配列を利用して担体等に固定化できるので、固定化による抗原性の低下又は喪失が生じにくい。

ポリペプチドAが、配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドである本発明の抗原ポリペプチドは、クラミジア・ニューモニエに特異的な抗原ポリペ

チドの全体を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

ポリペプチドAが、配列番号2又は5のアミノ酸配列からなるポリペプチドである本発明の抗原ポリペプチドは、クラミジア・ニューモニエに特異的な抗原部分を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

上記のいずれかの抗原ポリペプチドをコードするDNA若しくはそれに相補的なDNAである本発明のDNAは、クラミジア・ニューモニエの抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の診断等に好適な抗原ポリペプチドの製造に利用できる。

塩基配列が配列番号3の塩基配列である本発明のDNAは、クラミジア・ニューモニエに特異的な抗原ポリペプチドの全体をコードするので、クラミジア・ニューモニエの特異的抗体検査等に好適な抗原ポリペプチドの製造に利用できる。

塩基配列が配列番号4又は7の塩基配列である本発明のDNAは、クラミジア・ニューモニエに特異的な抗原部分をコードするので、クラミジア・ニューモニエの特異的抗体検査等に好適な抗原ポリペプチドの製造に利用できる。

上記のいずれかのDNAを含む本発明の組換えベクターは、クラミジア・ニューモニエの抗体検査やクラミジア・ニューモニエの感染症の診断に好適な抗原ポリペプチドの製造に利用できる。

配列番号10の塩基配列を有するpCPN533 α プラスミドである本発明の組換えベクターは、クラミジア・ニューモニエに特異的な抗原部分を有するポリペプチドを発現させることができるので、クラミジア・ニューモニエの特異的抗体検査等に極めて適切な抗原ポリペプチドの製造に利用できる。

上記のいずれかの組換えベクターを含む本発明の形質転換体は、クラミジア・ニューモニエの特異的抗体検査等に好適な抗原ポリペプチドの製造に利用できる。

上記のいずれかの抗原ポリペプチドを抗原として用いることを特徴とする本発明の抗クラミジア・ニューモニエ抗体の製造方法は、クラミジア・ニューモニエ感染の診断薬製造に利用できる。

上記のいずれかの抗原ポリペプチドを抗原として用いることを特徴とする本発明の抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定方法は、クラミジア・ニューモニエの抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の診断に好適である。

特に、アミノ酸配列の長さが短い抗原ポリペプチドを利用する場合は、担体等に固定化できる抗原ポリペプチドの数を多くすることができるので高感度である。

また、ポリペプチド中のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されている抗原ポリペプチドを利用する場合は、抗原ポリペプチドがタンパク質分解酵素による分解を受けにくい構造を作ることができるので安定性に優れており、検出・測定結果の信頼性が高い。

さらに、他のアミノ酸配列が付加された抗原ポリペプチドを利用する場合は、抗原として用いられるポリペプチドを、アミノ酸若しくは2～1000個のアミノ酸配列を利用して担体等に固定化できるので、固定化による抗原性の低下又は喪失が生じにくく、クラミジア・ニューモニエ感染を診断する上で優れている。

また、配列番号1のアミノ酸配列からなる抗原ポリペプチドを利用する場合は、抗原として用いられるポリペプチドがクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原ポリペプチド全体を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

また、配列番号2又は5のアミノ酸配列からなる抗原ポリペプチドを利用する場合は、抗原として用いられるポリペプチドがクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原部分を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

上記のいずれかの抗原ポリペプチドを抗原として含有してなる本発明の抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定用試薬は、クラミジア・ニューモニエの抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の診断に好適である。

特に、アミノ酸配列の長さが短い抗原ポリペプチドを利用する場合は、担体等に固定化できる抗原ポリペプチドの数を多くすることができるので高感度である。

また、ポリペプチド中のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されている抗原ポリペプチドを利用する場合は、抗原ポリペプチドがタンパク質分解酵素による分解を

受けにくい構造を作ることができるので安定性に優れており、検出・測定結果の信頼性が高い。

さらに、他のアミノ酸配列が付加された抗原ポリペプチドを利用する場合は、抗原として用いられるポリペプチドを、アミノ酸若しくは2～1000個のアミノ酸配列を科用して担体等に固定化できるので、固定化による抗原性の低下又は喪失が生じにくく、クラミジア・ニューモニエ感染を診断する上で優れている。

また、配列番号1のアミノ酸配列からなる抗原ポリペプチドを利用する場合は、抗原として用いられるポリペプチドがクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原ポリペプチド全体を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

また、配列番号2又は5のアミノ酸配列からなる抗原ポリペプチドを利用する場合は、抗原として用いられるポリペプチドがクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原部分を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

上記のいずれかの抗原ポリペプチドを有効成分とする本発明のクラミジア・ニューモニエ感染の診断薬は、クラミジア・ニューモニエ感染の診断に好適である。

に、アミノ酸配列の長さが短い抗原ポリペプチドを利用する場合は、担体等に固定化できる抗原ポリペプチドの数を多くすることができるので高感度である。

また、ポリペプチド中のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されている抗原ポリペプチドを利用する場合は、抗原ポリペプチドがタンパク質分解酵素による分解を受けにくい構造を作ることができるので安定性に優れており、検出・測定結果の信頼性が高い。

さらに、他のアミノ酸配列が付加された抗原ポリペプチドを利用する場合は、抗原として用いられるポリペプチドを、アミノ酸若しくは2～1000個のアミノ酸配列を利用して担体等に固定化できるので、固定化による抗原性の低下又は喪失が生じにくく、クラミジア・ニューモニエ感染を診断する上で優れている。

また、配列番号1のアミノ酸配列からなる抗原ポリペプチドを利用する場合は、

抗原として用いられるポリペプチドがクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原ポリペプチド全体を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

また、配列番号2又は5のアミノ酸配列からなる抗原ポリペプチドを利用する場合は、抗原として用いられるポリペプチドがクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原部分を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

配列番号14のポリペプチドに、直接に又は介在アミノ酸配列を介して、配列番号1のポリペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸配列を含むポリペプチドAが結合した本発明の融合タンパク質は、クラミジア・ニューモニエの抗体検査等に利用できる。

ポリペプチドAが、配列番号1のポリペプチドからアミノ酸1～250個が欠落しているポリペプチドである本発明の融合タンパク質は、アミノ酸配列の長さが短いため、担体等に固定化できる抗原ペプチドの数を多くすることができ、それにより、感度の高い診断薬の製造に利用できる。

ポリペプチドAが、配列番号1のポリペプチドの中のアミノ酸1～100個が他のアミノ酸で置換されているポリペプチドである本発明の融合タンパク質は、タンパク質分解酵素による分解を受けにくい構造を作ることができるので、抗原として安定性に優れる。

配列番号15のアミノ酸配列からなるポリペプチドである本発明の融合タンパク質は、クラミジア・ニューモニエに特異的な抗原ポリペプチドの全体を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

配列番号16のアミノ酸配列からなるポリペプチドである本発明の融合タンパク質は、クラミジア・ニューモニエに特異的な抗原部分を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

上記のいずれかの融合タンパク質をコードするDNA若しくはそれに相補的なDNAである本発明のDNAは、クラミジア・ニューモニエの抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の診断等に好適な融合タンパク質の製造に利用できる。

塩基配列が配列番号 17 の塩基配列である本発明の DNA は、この DNA にコードされている融合タンパク質がクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原ポリペプチドの全体を有するので、クラミジア・ニューモニエの特異的抗体検査等に好適な融合タンパク質の製造に利用できる。

塩基配列が配列番号 18 の塩基配列である本発明の DNA は、この DNA にコードされている融合タンパク質がクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原部分を有するので、クラミジア・ニューモニエの特異的抗体検査等に好適な融合タンパク質の製造に利用できる。

上記のいずれかの DNA を含む本発明の組換えベクターは、クラミジア・ニューモニエの抗体検査やクラミジア・ニューモニエの感染症の診断に好適な融合タンパク質の製造に利用できる。

pCPN533T プラスミドである本発明の組換えベクターは、クラミジア・ニューモニエに特異的な抗原部分を有する融合タンパク質を発現させることができるので、クラミジア・ニューモニエの特異的抗体検査等に極めて適切な融合タンパク質の製造に利用できる。

上記のいずれかの組換えベクターを含む本発明の形質転換体は、クラミジア・ニューモニエの特異的抗体検査等に好適な融合タンパク質の製造に利用できる。

上記のいずれかの融合タンパク質を抗原として用いることを特徴とする本発明の抗クラミジア・ニューモニエ抗体の製造方法は、クラミジア・ニューモニエ感染の診断薬製造に利用できる。

上記のいずれかに記載の融合タンパク質を抗原として用いることを特徴とする本発明の抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定方法は、クラミジア・ニューモニエの抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の診断に好適である。

特に、アミノ酸配列の長さが短い融合タンパク質を利用する場合は、担体等に固定化できる抗原ポリペプチドの数を多くすることができるので高感度である。

また、ポリペプチド中のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されている融合タンパク質を利用する場合は、融合タンパク質がタンパク質分解酵素による分解を受けにくい構造を作ることができるので安定性に優れており、検出・測定結果の信頼

性が高い。

また、配列 号 15 のアミノ酸配列からなる融合タンパク質を利用する場合は、抗原として用いられる融合タンパク質がクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原ポリペプチド全体を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

また、配列番号 16 のアミノ酸配列からなる融合タンパク質を利用する場合は、抗原として用いられる融合タンパク質がクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原部分を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

上記のいずれかの融合タンパク質を抗原として含有してなる本発明の抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定用試薬は、クラミジア・ニューモニエの抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の診断に好適である。

特に、アミノ酸配列の長さが短い融合タンパク質を利用する場合は、担体等に固定化できる抗原ポリペプチドの数を多くすることができるので高感度である。

また、ポリペプチド中のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されている融合タンパク質を利用する場合は、融合タンパク質がタンパク質分解酵素による分解を受けにくい構造を作ることができるので安定性に優れており、検出・測定結果の信頼性が高い。

また、配列番号 15 のアミノ酸配列からなる融合タンパク質を利用する場合は、抗原として用いられる融合タンパク質がクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原ポリペプチド全体を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

また、配列番号 16 のアミノ酸配列からなる融合タンパク質を利用する場合は、抗原として用いられる融合タンパク質がクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原部分を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

上記のいずれかの融合タンパク質を有効成分とする本発明のクラミジア・ニューモニエ感染の診断薬は、クラミジア・ニューモニエの抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の診断に好適である。

特に、アミノ酸配列の長さが短い融合タンパク質を利用する場合は、担体等に固定化できる抗原ポリペプチドの数を多くすることができるので高感度である。

また、ポリペプチド中のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されている融合タンパク質を利用する場合は、融合タンパク質がタンパク質分解酵素による分解を受けにくい構造を作ることができるので安定性に優れており、検出・測定結果の信頼性が高い。

また、配列番号 15 のアミノ酸配列からなる融合タンパク質を利用する場合は、抗原として用いられる融合タンパク質がクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原ポリペプチド全体を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

また、配列番号 16 のアミノ酸配列からなる融合タンパク質を利用する場合は、抗原として用いられる融合タンパク質がクラミジア・ニューモニエに特異的な抗原部分を有するので、抗体検査やクラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に極めて適切である。

本発明のプロープ及びプライマーは、クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定やクラミジア・ニューモニエ感染の診断に好適である。

特に、配列番号 19 又は 20 の塩基配列を有するプロープ及びプライマーは、クラミジア・ニューモニエに特異的な塩基配列を有するので、クラミジア・ニューモニエ感染の正確な診断に利用できる。

上記のいずれかのプロープ又はプライマーを用いる本発明のクラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定方法は、クラミジア・ニューモニエ感染の診断に好適である。

上記のいずれかのプロープ又はプライマーを含有してなる本発明のクラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用試薬は、クラミジア・ニューモニエ感染の診断に好適である。

上記のいずれかのプロープ又はプライマーを有効成分とする本発明のクラミジア・ニューモニエ感染の診断薬は、クラミジア・ニューモニエ感染の診断に好適である。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 488

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列

Met	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Pro	Asp	Asn	Gln	Lys	Asn	Ile	Met
1				5					10					15	
Ser	Gln	Val	Leu	Thr	Ser	Thr	Pro	Gln	Gly	Val	Pro	Gln	Gln	Asp	Lys
			20					25						30	
Leu	Ser	Gly	Asn	Glu	Thr	Lys	Gln	Ile	Gln	Gln	Thr	Arg	Gln	Gly	Lys
			35					40						45	
Asn	Thr	Glu	Met	Glu	Ser	Asp	Ala	Thr	Ile	Ala	Gly	Ala	Ser	Gly	Lys
			50					55						60	
Asp	Lys	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr	Ala	Pro	Gln	Gln	Gly
			65				70				75			80	
Val	Ala	Ala	Gly	Lys	Glu	Ser	Ser	Glu	Ser	Gln	Lys	Ala	Gly	Ala	Asp
							85				90			95	
Thr	Gly	Val	Ser	Gly	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Thr
							100				105			110	
Lys	Ile	Ala	Met	Gln	Thr	Ser	Ile	Glu	Glu	Ala	Ser	Lys	Ser	Met	Glu
							115							125	
Ser	Thr	Leu	Glu	Ser	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser	Ala	Ala	Gln	Met	Lys	Glu
							130					135		140	
Val	Glu	Ala	Val	Val	Val	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	Lys	Ser	Ser	Gly	Ser
							145				150			155	
Ala	Lys	Leu	Glu	Thr	Pro	Glu	Leu	Pro	Lys	Pro	Gly	Val	Thr	Pro	Arg
							165				170			175	

Ser Glu Val Ile Glu Ile Gly Leu Ala Leu Ala Lys Ala Ile Gln Thr

180

185

190

Leu Gly Glu Ala Thr Lys Ser Ala Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Thr Gln

195

200

205

Ala Gln Ala Asp Gln Thr Asn Lys Leu Gly Leu Glu Lys Gln Ala Ile

210

215

220

Lys Ile Asp Lys Glu Arg Glu Glu Tyr Gln Glu Met Lys Ala Ala Glu

225

230

235

240

Gln Lys Ser Lys Asp Leu Glu Gly Thr Met Asp Thr Val Asn Thr Val

245

250

255

Met Ile Ala Val Ser Val Ala Ile Thr Val Ile Ser Ile Val Ala Ala

260

265

270

Ile Phe Thr Cys Gly Ala Gly Leu Ala Gly Leu Ala Ala Gly Ala Ala

275

280

285

Val Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr

290

295

300

Thr Val Ala Thr Gln Ile Thr Val Gln Ala Val Val Gln Ala Val Lys

305

310

315

320

Gln Ala Val Ile Thr Ala Val Arg Gln Ala Ile Thr Ala Ala Ile Lys

325

330

335

Ala Ala Val Lys Ser Gly Ile Lys Ala Phe Ile Lys Thr Leu Val Lys

340

345

350

Ala Ile Ala Lys Ala Ile Ser Lys Gly Ile Ser Lys Val Phe Ala Lys

355

360

365

Gly Thr Gln Met Ile Ala Lys Asn Phe Pro Lys Leu Ser Lys Val Ile

370

375

380

Ser Ser Leu Thr Ser Lys Trp Val Thr Val Gly Val Gly Val Val Val

385

390

395

400

Ala Ala Pro Ala Leu Gly Lys Gly Ile Met Gln Met Gln Leu Ser Glu

405 410 415
 Met Gln Gln Asn Val Ala Gln Phe Gln Lys Glu Val Gly Lys Leu Gln
 420 425 430
 Ala Ala Ala Asp Met Ile Ser Met Phe Thr Gln Phe Trp Gln Gln Ala
 435 440 445
 Ser Lys Ile Ala Ser Lys Gln Thr Gly Glu Ser Asn Glu Met Thr Gln
 450 455 460
 Lys Ala Thr Lys Leu Gly Ala Gln Ile Leu Lys Ala Tyr Ala Ala Ile
 465 470 475 480
 Ser Gly Ala Ile Ala Gly Ala Ala
 485 488

配列番号 : 2

配列の長さ : 271

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Ser Ile Ser Ser Ser Ser Gly Pro Asp Asn Gln Lys Asn Ile Met
 1 5 10 15
 Ser Gln Val Leu Thr Ser Thr Pro Gln Gly Val Pro Gln Gln Asp Lys
 20 25 30
 Leu Ser Gly Asn Glu Thr Lys Gln Ile Gln Gln Thr Arg Gln Gly Lys
 35 40 45
 Asn Thr Glu Met Glu Ser Asp Ala Thr Ile Ala Gly Ala Ser Gly Lys
 50 55 60
 Asp Lys Thr Ser Ser Thr Thr Lys Thr Glu Thr Ala Pro Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Val Ala Ala Gly Lys Glu Ser Ser Glu Ser Gln Lys Ala Gly Ala Asp
 85 90 95

Thr Gly Val Ser Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ser Asn Thr Ala Thr
 100 105 110
 Lys Ile Ala Met Gln Thr Ser Ile Glu Glu Ala Ser Lys Ser Met Glu
 115 120 125
 Ser Thr Leu Glu Ser Leu Gln Ser Leu Ser Ala Ala Gln Met Lys Glu
 130 135 140
 Val Glu Ala Val Val Val Ala Ala Leu Ser Gly Lys Ser Ser Gly Ser
 145 150 155 160
 Ala Lys Leu Glu Thr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Gly Val Thr Pro Arg
 165 170 175
 Ser Glu Val Ile Glu Ile Gly Leu Ala Leu Ala Lys Ala Ile Gln Thr
 180 185 190
 Leu Gly Glu Ala Thr Lys Ser Ala Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Thr Gln
 195 200 205
 Ala Gln Ala Asp Gln Thr Asn Lys Leu Gly Leu Glu Lys Gln Ala Ile
 210 215 220
 Lys Ile Asp Lys Glu Arg Glu Glu Tyr Gln Glu Met Lys Ala Ala Glu
 225 230 235 240
 Gln Lys Ser Lys Asp Leu Glu Gly Thr Met Asp Thr Val Asn Thr Val
 245 250 255
 Met Ile Ala Lys Gly Phe Glu Leu Pro Trp Gly Pro Leu Ile Asn
 260 265 270 271

配列番号 : 3

配列の長さ : 1464

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ATG TCT ATT TCA TCT TCT TCA GGA CCT GAC AAT CAA AAA AAT ATC ATG 48
 Met Ser Ile Ser Ser Ser Ser Gly Pro Asp Asn Gln Lys Asn Ile Met
 1 5 10 15
 TCT CAA GTT CTG ACA TCG ACA CCC CAG GGC GTG CCC CAA CAA GAT AAG 96
 Ser Gln Val Leu Thr Ser Thr Pro Gln Gly Val Pro Gln Gln Asp Lys
 20 25 30
 CTG TCT GGC AAC GAA ACG AAG CAA ATA CAG CAA ACA CGT CAG GGT AAA 144
 Leu Ser Gly Asn Glu Thr Lys Gln Ile Gln Gln Thr Arg Gln Gly Lys
 35 40 45
 AAC ACT GAG ATG GAA AGC GAT GCC ACT ATT GCT GGT GCT TCT GGA AAA 192
 Asn Thr Glu Met Glu Ser Asp Ala Thr Ile Ala Gly Ala Ser Gly Lys
 50 55 60
 GAC AAA ACT TCC TCG ACT ACA AAA ACA GAA ACA GCT CCA CAA CAG GGA 240
 Asp Lys Thr Ser Ser Thr Thr Lys Thr Glu Thr Ala Pro Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 GTT GCT GCT GGC AAA GAA TCC TCA GAA AGT CAA AAG GCA GGT GCT GAT 288
 Val Ala Ala Gly Lys Glu Ser Ser Glu Ser Gln Lys Ala Gly Ala Asp
 85 90 95
 ACT GGA GTA TCA GGA GCG GCT GCT ACT ACA GCA TCA AAT ACT GCA ACA 336
 Thr Gly Val Ser Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ser Asn Thr Ala Thr
 100 105 110
 AAA ATT GCT ATG CAG ACC TCT ATT GAA GAG GCG AGC AAA AGT ATG GAG 384

Lys Ile Ala Met Gln Thr Ser Ile Glu Glu Ala Ser Lys Ser Met Glu	
115 120 125	
TCT ACC TTA GAG TCA CTT CAA AGC CTC AGT GCC GCG CAA ATG AAA GAA	432
Ser Thr Leu Glu Ser Leu Gln Ser Leu Ser Ala Ala Gln Met Lys Glu	
130 135 140	
GTC GAA GCG GTT GTT GTT GCT GCC CTC TCA GGG AAA AGT TCG GGT TCC	480
Val Glu Ala Val Val Val Ala Ala Leu Ser Gly Lys Ser Ser Gly Ser	
145 150 155 160	
GCA AAA TTG GAA ACA CCT GAG CTC CCC AAG CCC GGG GTG ACA CCA AGA	528
Ala Lys Leu Glu Thr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Gly Val Thr Pro Arg	
165 170 175	
TCA GAG GTT ATC GAA ATC GGA CTC GCG CTT GCT AAA GCA ATT CAG ACA	576
Ser Glu Val Ile Glu Ile Gly Leu Ala Leu Ala Lys Ala Ile Gln Thr	
180 185 190	
TTG GGA GAA GCC ACA AAA TCT GCC TTA TCT AAC TAT GCA AGT ACA CAA	624
Leu Gly Glu Ala Thr Lys Ser Ala Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Thr Gln	
195 200 205	
GCA CAA GCA GAC CAA ACA AAT AAA CTA GGT CTA GAA AAG CAA GCG ATA	672
Ala Gln Ala Asp Gln Thr Asn Lys Leu Gly Leu Glu Lys Gln Ala Ile	
210 215 220	
AAA ATC GAT AAA GAA CGA GAA GAA TAC CAA GAG ATG AAG GCT GCC GAA	720

6 2

340	345	350	
GCG ATT GCC AAA GCC ATT TCT AAA GGA ATC TCT AAG GTT TTC GCT AAG			1104
Ala Ile Ala Lys Ala Ile Ser Lys Gly Ile Ser Lys Val Phe Ala Lys			
355	360	365	
GGA ACT CAA ATG ATT GCG AAG AAC TTC CCC AAG CTC TCG AAA GTC ATC			1152
Gly Thr Gln Met Ile Ala Lys Asn Phe Pro Lys Leu Ser Lys Val Ile			
370	375	380	
TCG TCT CTT ACC AGT AAA TGG GTC ACG GTT GGG GTT GGG GTT GTA GTT			1200
Ser Ser Leu Thr Ser Lys Trp Val Thr Val Gly Val Gly Val Val Val			
385	390	395	400
GCG GCG CCT GCT CTC GGT AAA GGG ATT ATG CAA ATG CAG CTC TCG GAG			1248
Ala Ala Pro Ala Leu Gly Lys Gly Ile Met Gln Met Gln Leu Ser Glu			
405	410	415	
ATG CAA CAA AAC GTC GCT CAA TTT CAG AAA GAA GTC GGA AAA CTG CAG			1296
Met Gln Gln Asn Val Ala Gln Phe Gln Lys Glu Val Gly Lys Leu Gln			
420	425	430	
GCT GCG GCT GAT ATG ATT TCT ATG TTC ACT CAA TTT TGG CAA CAG GCA			1344
Ala Ala Ala Asp Met Ile Ser Met Phe Thr Gln Phe Trp Gln Gln Ala			
435	440	445	
AGT AAA ATT GCC TCA AAA CAA ACA GGC GAG TCT AAT GAA ATG ACT CAA			1392
Ser Lys Ile Ala Ser Lys Gln Thr Gly Glu Ser Asn Glu Met Thr Gln			
450	455	460	

AAA GCT ACC AAG CTG GGC GCT CAA ATC CTT AAA GCG TAT GCC GCA ATC 1440

Lys Ala Thr Lys Leu Gly Ala Gln Ile Leu Lys Ala Tyr Ala Ala Ile

465

470

475

480

AGC GGA GCC ATC GCT GGC GCA GCA

1464

Ser Gly Ala Ile Ala Gly Ala Ala

485

488

配列番号 : 4

配列の長さ : 813

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ATG TCT ATT TCA TCT TCT TCA GGA CCT GAC AAT CAA AAA AAT ATC ATG 48

Met Ser Ile Ser Ser Ser Ser Gly Pro Asp Asn Gln Lys Asn Ile Met

1

5

10

15

TCT CAA GTT CTG ACA TCG ACA CCC CAG GGC GTG CCC CAA CAA GAT AAG 96

Ser Gln Val Leu Thr Ser Thr Pro Gln Gly Val Pro Gln Gln Asp Lys

20

25

30

CTG TCT GGC AAC GAA ACG AAG CAA ATA CAG CAA ACA CGT CAG GGT AAA 144

Leu Ser Gly Asn Glu Thr Lys Gln Ile Gln Gln Thr Arg Gln Gly Lys

35

40

45

AAC ACT GAG ATG GAA AGC GAT GCC ACT ATT GCT GGT GCT TCT GGA AAA 192

Asn Thr Glu Met Glu Ser Asp Ala Thr Ile Ala Gly Ala Ser Gly Lys
 50 55 60
 GAC AAA ACT TCC TCG ACT ACA AAA ACA GAA ACA GCT CCA CAA CAG GGA 240

Asp Lys Thr Ser Ser Thr Thr Lys Thr Glu Thr Ala Pro Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 GTT GCT GCT GGG AAA GAA TCC TCA GAA AGT CAA AAG GCA GGT GCT GAT 288

Val Ala Ala Gly Lys Glu Ser Ser Glu Ser Gln Lys Ala Gly Ala Asp
 85 90 95
 ACT GGA GTA TCA GGA GCG GCT GCT ACT ACA GCA TCA AAT ACT GCA ACA 336

Thr Gly Val Ser Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ser Asn Thr Ala Thr
 100 105 110
 AAA ATT GCT ATG CAG ACC TCT ATT GAA GAG GCG AGC AAA AGT ATG GAG 384

Lys Ile Ala Met Gln Thr Ser Ile Glu Glu Ala Ser Lys Ser Met Glu
 115 120 125
 TCT ACC TTA GAG TCA CTT CAA AGC CTC AGT GCC GCG CAA ATG AAA GAA 432

Ser Thr Leu Glu Ser Leu Gln Ser Leu Ser Ala Ala Gln Met Lys Glu
 130 135 140
 GTC GAA GCG GTT GTT GTT GCT GCC CTC TCA GGG AAA AGT TCG GGT TCC 480

Val Glu Ala Val Val Val Ala Ala Leu Ser Gly Lys Ser Ser Gly Ser
 145 150 155 160
 GCA AAA TTG GAA ACA CCT GAG CTC CCC AAG CCC GGG GTG ACA CCA AGA 528

Ala Lys Leu Glu Thr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Gly Val Thr Pro Arg

165	170	175	
TCA GAG GTT ATC GAA ATC GGA CTC GCG CTT GCT AAA GCA ATT CAG ACA			576
Ser Glu Val Ile Glu Ile Gly Leu Ala Leu Ala Lys Ala Ile Gln Thr			
180	185	190	
TTG GGA GAA GCC ACA AAA TCT GCC TTA TCT AAC TAT GCA AGT ACA CAA			624
Leu Gly Glu Ala Thr Lys Ser Ala Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Thr Gln			
195	200	205	
GCA CAA GCA GAC CAA ACA AAT AAA CTA GGT CTA GAA AAG CAA GCG ATA			672
Ala Gln Ala Asp Gln Thr Asn Lys Leu Gly Leu Glu Lys Gln Ala Ile			
210	215	220	
AAA ATC GAT AAA GAA CGA GAA GAA TAC CAA GAG ATG AAG GCT GCC GAA			720
Lys Ile Asp Lys Glu Arg Glu Glu Tyr Gln Glu Met Lys Ala Ala Glu			
225	230	235	240
CAG AAG TCT AAA GAT CTC GAA GGA ACA ATG GAT ACT GTC AAT ACT GTG			768
Gln Lys Ser Lys Asp Leu Glu Gly Thr Met Asp Thr Val Asn Thr Val			
245	250	255	
ATG ATC GCG AAG GGG TTC GAA TTG CCA TGG GGG CCC TTA ATT AAT			813
Met Ile Ala Lys Gly Phe Glu Leu Pro Trp Gly Pro Leu Ile Asn			
260	265	270 271	

配列番号 : 5

配列の長さ : 259

配列の型 : アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ser Ile Ser Ser Ser Ser Gly Pro Asp Asn Gln Lys Asn Ile Met
 1 5 10 15
 Ser Gln Val Leu Thr Ser Thr Pro Gln Gly Val Pro Gln Gln Asp Lys
 20 25 30
 Leu Ser Gly Asn Glu Thr Lys Gln Ile Gln Gln Thr Arg Gln Gly Lys
 35 40 45
 Asn Thr Glu Met Glu Ser Asp Ala Thr Ile Ala Gly Ala Ser Gly Lys
 50 55 60
 Asp Lys Thr Ser Ser Thr Thr Lys Thr Glu Thr Ala Pro Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Val Ala Ala Gly Lys Glu Ser Ser Glu Ser Gln Lys Ala Gly Ala Asp
 85 90 95
 Thr Gly Val Ser Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ser Asn Thr Ala Thr
 100 105 110
 Lys Ile Ala Met Gln Thr Ser Ile Glu Glu Ala Ser Lys Ser Met Glu
 115 120 125
 Ser Thr Leu Glu Ser Leu Gln Ser Leu Ser Ala Ala Gln Met Lys Glu
 130 135 140
 Val Glu Ala Val Val Val Ala Ala Leu Ser Gly Lys Ser Ser Gly Ser
 145 150 155 160
 Ala Lys Leu Glu Thr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Gly Val Thr Pro Arg
 165 170 175
 Ser Glu Val Ile Glu Ile Gly Leu Ala Leu Ala Lys Ala Ile Gln Thr
 180 185 190
 Leu Gly Glu Ala Thr Lys Ser Ala Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Thr Gln
 195 200 205

Ala Gln Ala Asp Gln Thr Asn Lys Leu Gly Leu Glu Lys Gln Ala Ile
 210 215 220
 Lys Ile Asp Lys Glu Arg Glu Glu Tyr Gln Glu Met Lys Ala Ala Glu
 225 230 235 240
 Gln Lys Ser Lys Asp Leu Glu Gly Thr Met Asp Thr Val Asn Thr Val
 245 250 255
 Met Ile Ala
 259

配列番号 : 6

配列の長さ : 571

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Pro Lys Gln Ala Glu Tyr Thr Trp Gly Ser Lys Lys Ile Leu Asp
 1 5 10 15
 Asn Ile Glu Cys Leu Thr Glu Asp Val Ala Glu Phe Lys Asp Leu Leu
 20 25 30
 Tyr Thr Ala His Arg Ile Thr Ser Ser Glu Glu Glu Ser Asp Asn Glu
 35 40 45
 Ile Gln Pro Gly Ala Ile Leu Lys Gly Thr Val Val Asp Ile Asn Lys
 50 55 60
 Asp Phe Val Val Val Asp Val Gly Leu Lys Ser Glu Gly Val Ile Pro
 65 70 75 80
 Met Ser Glu Phe Ile Asp Ser Ser Glu Gly Leu Val Leu Gly Ala Glu
 85 90 95
 Val Glu Val Tyr Leu Asp Gln Ala Glu Asp Glu Glu Gly Lys Val Val
 100 105 110

Leu Ser Arg Glu Lys Ala Thr Arg Gln Arg Gln Trp Glu Tyr Ile Leu
 115 120 125
 Ala His Cys Glu Glu Gly Ser Ile Val Lys Gly Gln Ile Thr Arg Lys
 130 135 140
 Val Lys Gly Gly Leu Ile Val Asp Ile Gly Met Glu Ala Phe Leu Pro
 145 150 155 160
 Gly Ser Gln Ile Asp Asn Lys Lys Ile Lys Asn Leu Asp Asp Tyr Val
 165 170 175
 Gly Lys Val Cys Glu Phe Lys Ile Leu Lys Ile Asn Val Glu Arg Arg
 180 185 190
 Asn Ile Val Val Ser Arg Arg Glu Leu Leu Glu Ala Glu Arg Ile Ser
 195 200 205
 Lys Lys Ala Glu Leu Ile Glu Gln Ile Ser Ile Gly Glu Tyr Arg Lys
 210 215 220
 Gly Val Val Lys Asn Ile Thr Asp Phe Gly Val Phe Leu Asp Leu Asp
 225 230 235 240
 Gly Ile Asp Gly Leu Leu His Ile Thr Asp Met Thr Trp Lys Arg Ile
 245 250 255
 Arg His Pro Ser Glu Met Val Glu Leu Asn Gln Glu Leu Glu Val Ile
 260 265 270
 Ile Leu Ser Val Asp Lys Glu Lys Gly Arg Val Ala Leu Gly Leu Lys
 275 280 285
 Gln Lys Glu His Asn Pro Trp Glu Asp Ile Glu Lys Lys Tyr Pro Pro
 290 295 300
 Gly Lys Arg Val Leu Gly Lys Ile Val Lys Leu Leu Pro Tyr Gly Ala
 305 310 315 320
 Phe Ile Glu Ile Glu Glu Gly Ile Glu Gly Leu Ile His Ile Ser Glu
 325 330 335
 Met Ser Trp Val Lys Asn Ile Val Asp Pro Ser Glu Val Val Asn Lys

340	345	350
Gly Asp Glu Val Glu Ala Ile Val Leu Ser Ile Gln Lys Asp Glu Gly		
355	360	365
Lys Ile Ser Leu Gly Leu Lys Gln Thr Glu Arg Asn Pro Trp Asp Asn		
370	375	380
Ile Glu Glu Lys Tyr Pro Ile Gly Leu His Val Asn Ala Glu Ile Lys		
380	385	390
Asn Leu Thr Asn Tyr Gly Ala Phe Val Glu Leu Glu Pro Gly Ile Glu		
400	405	410
Gly Leu Ile His Ile Ser Asp Met Ser Trp Ile Lys Lys Val Ser His		
415	420	425
Pro Ser Glu Leu Phe Lys Lys Gly Asn Ser Val Glu Ala Val Ile Leu		
430	435	440
Ser Val Asp Lys Glu Ser Lys Lys Ile Thr Leu Gly Val Lys Gln Leu		
445	450	455
Ser Ser Asn Pro Trp Asn Glu Ile Glu Ala Met Phe Pro Ala Gly Thr		
460	465	470
Val Ile Ser Gly Val Val Thr Lys Ile Thr Ala Phe Gly Ala Phe Val		
480	485	490
Glu Leu Gln Asn Gly Ile Glu Gly Leu Ile His Val Ser Glu Leu Ser		
495	500	505
Asp Lys Pro Phe Ala Lys Ile Glu Asp Ile Ile Ser Ile Gly Glu Asn		
510	515	520
Val Ser Ala Lys Val Ile Lys Leu Asp Pro Asp His Lys Lys Val Ser		
525	530	535
Leu Ser Val Lys Glu Tyr Leu Ala Asp Asn Ala Tyr Asp Gln Asp Ser		
540	545	550
Arg Thr Glu Leu Asp Phe Lys Asp Ser Gln Gly		
565	570	571

配列番号 : 7

配列の長さ : 777

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

ATGTCTATTT CATCTTCTTC AGGACCTGAC AATCAAAAAA ATATCATGTC TCAAGTTCTG	60
ACATCGACAC CCCAGGGCGT GCCCCAACAA GATAAGCTGT CTGGCAACGA AACGAAGCAA	120
ATACAGCAAA CACGTCAGGG TAAAAACACT GAGATGGAAA GCGATGCCAC TATTGCTGGT	180
GCTTCTGGAA AAGACAAAAC TTCCTEGACT AAAAAACAG AAACAGCTCC ACAACAGGGA	240
GTTGCTGCTG GGAAAGAATC CTCAGAAAGT CAAAAGGCAG GTGCTGATAC TGGAGTATCA	300
GGAGCGGCTG CTA CTACAGC ATCAAATACT GCAACAAAAA TTGCTATGCA GACCTCTATT	360
GAAGAGGCGA GCAAAAGTAT GGAGTCTACC TTAGAGTCAC TTCAAAGCCT CAGTGCCGCG	420
CAAATGAAAG AAGTCGAAGC GGTGTGTTGTT GCTGCCCTCT CAGGGAAAAG TTCGGGTTCC	480
GCAAAATTGG AAACACCTGA GCTCCCCAAG CCCGGGGTGA CACCAAGATC AGAGGTTATC	540
GAAATCGGAC TCGCGCTTGC TAAAGCAATT CAGACATTGG GAGAAGCCAC AAAATCTGCC	600
TTATCTAACT ATGCAAGTAC ACAAGCACAA GCAGACCAAA CAAATAAACT AGGTCTAGAA	660

AAGCAAGCGA TAAAAATCGA TAAAGAACGA GAAGAATACC AAGAGATGAA GGCTGCCGAA 720

CAGAAGTCTA AAGATCTCGA AGGAACAATG GATACTGTCA ATACTGTGAT GATCGCG 777

配列番号 : 8

配列の長さ : 1712

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

ATGCCAAAAC AAGCTGAATA TACTTGGGGA TCTAAAAAAA TTCTGGACAA TATAGAATGC 60

CTCACAGAAG ACGTTGCCGA ATTTAAAGAT TTGCTTTATA CGGCACACAG AATTACTTCG 120

AGCGAAGAAG AATCTGATAA CGAAATACAG CCTGGCGCCA TCCTAAAAGG TACCGTAGTT 180

GATATTAATA AAGACTTTGT CGTAGTTGAT GTTGGTCTGA AGTCTGAGGG AGTGATCCCT 240

ATGTCAGAGT TCATAGACTC TTCAGAAGGT TTAGTGCTTG GAGCTGAAGT AGAAGTCTAT 300

CTCGACCAAG CCGAAGACGA AGAGGGCAAA GTTGTCTTTT CTAGAGAAAA AGCCACACGA 360

CAACGTCAAT GGAATACAT CTTAGCTCAT TGTGAAGAAG GTTCTATTGT TAAAGGTCAA 420

ATTACACGTA AAGTCAAAGG CGGCCTTATT GTAGATATTG GAATGGAAGC CTTCCCTACCT 480

GGATCACAAA TTGACAACAA GAAAATCAAA AATTTAGATG ATTATGTCCG AAAAGTTTGT 540

GAATTCAAAA TTTTAAAAAT TAACGTTGAA CGTCGCAATA TTGTTGTCTC AAGAAGAGAA 600

CTCTTAGAAG CTGAGAGAAT CTCTAAGAAA GCCGAACTTA TTGAACAAAT TTCTATCGGA 660

GAATACCGCA AAGGAGTTGT TAAAAACATT ACTGACTTTG GTGTATTCTT AGATCTCGAT 720

GGTATTGACG GTCTTCTCCA CATTACCGAT ATGACCTGGA AGCGCATACG ACATCCTTCC 780

GAAATGGTCG AATTGAATCA AGAGTTGGAA GTAATTATTT TAAGCGTAGA TAAAGAAAAA 840

GGACGAGTTG CTCTAGGTCT CAAACAAAAA GAGCATAATC CTTGGGAAGA TATTGAGAAG 900

AAATACCCTC CTGGAAAACG AGTTCTTGGT AAAATTGTGA AGCTTCTCCC CTACGGAGCT 960

TTCATTGAAA TTGAAGAGGG CATTGAAGGT CTAATTCACA TTTCTGAAAT GTCTTGGGTG 1020

AAAAATATTG TAGATCCTAG TGAAGTCGTA AATAAAGGCG ATGAAGTTGA AGCCATTGTT 1080

CTATCTATTC AGAAGGACGA AGGAAAAATT TCTCTAGGAT TAAAGCAAAC AGAACGTAAT 1140

CCTTGGGACA ATATCGAAGA AAAATATCCT ATAGGTCTCC ATGTCAATGC TGAAATCAAG 1200

AACTTAACCA ATTACGGTGC TTTCGTTGAA TTAGAACCAG GAATTGAGGG TCTGATTCAT 1260

ATTTCTGACA TGAGTTGGAT TAAAAAGTC TCTCACCCTT CAGAACTATT CAAAAAGGA 1320

AATTCTGTAG AGGCTGTTAT TTTATCAGTA GACAAAGAAA GTAAAAAAT TACTTTAGGA 1380

GTTAAGCAAT TAAGTTCTAA TCCTTGAAT GAAATTGAAG CTATGTTCCC TGCTGGCACA 1440
GTAATTTTCAG GAGTTGTGAC TAAAATCACT GCATTTGGAG CCTTTGTTGA GCTACAAAAC 1500
GGGATTGAAG GATTGATTCA CGTTTCAGAA CTTTCTGACA AGCCCTTTGC AAAAATTGAA 1560
GATATTATCT CCATTGGAGA AAATGTTTCT GCAAAAGTAA TTAAGCTAGA TCCAGATCAT 1620
AAAAAAGTTT CTCTTTCTGT AAAAGAATAC TTAGCTGACA ATGCTTATGA TCAAGACTCT 1680
AGGACTGAAT TAGATTTCAA GGATTCTCAA GG 1712

配列番号 : 9

配列の長さ : 1048

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : C. ニューモニエ

株名 : YK-41

直接の起源

クローン : 53-3S

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 236..1012

特徴を決定した方法 : P

配列

TCAGTATCGG CGGAATTCGA ACCCCTTCGC GGCTCTTTCT GGAAGTCTAG AATCTTTACA 60

TCTCGAAGAG TTAAGTCAAG GATTATTCCC TTCTGCCCAA GAAGATGCCA ACTTCGCAAA 120

GGAGTTATCT TCAGTAGTAC ACGGATTAAA AAACCTAACC ACTGTAGTTA ATAAACAAAT 180

GGTTAAAGGC GCTGAGTAAA GCCCTTTGCA GAATCAAACC CCTTAGGATA CAAAC ATG 238

Met

1

TCT ATT TCA TCT TCT TCA GGA CCT GAC AAT CAA AAA AAT ATC ATG TCT 286

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Gly Pro Asp Asn Gln Lys Asn Ile Met Ser

5

10

15

CAA GTT CTG ACA TCG ACA CCC CAG GGC GTG CCC CAA CAA GAT AAG CTG 334

Gln Val Leu Thr Ser Thr Pro Gln Gly Val Pro Gln Gln Asp Lys Leu

20

25

30

TCT GGC AAC GAA ACG AAG CAA ATA CAG CAA ACA CGT CAG GGT AAA AAC 382

Ser Gly Asn Glu Thr Lys Gln Ile Gln Gln Thr Arg Gln Gly Lys Asn

35

40

45

ACT GAG ATG GAA AGC GAT GCC ACT ATT GCT GGT GCT TCT GGA AAA GAC 430

Thr Glu Met Glu Ser Asp Ala Thr Ile Ala Gly Ala Ser Gly Lys Asp

50

55

60

65

AAA ACT TCC TCG ACT ACA AAA ACA GAA ACA GCT CCA CAA CAG GGA GTT 478

Lys Thr Ser Ser Thr Thr Lys Thr Glu Thr Ala Pro Gln Gln Gly Val
 70 75 80
 GCT GCT GGG AAA GAA TCC TCA GAA AGT CAA AAG GCA GGT GCT GAT ACT 526

Ala Ala Gly Lys Glu Ser Ser Glu Ser Gln Lys Ala Gly Ala Asp Thr
 85 90 95
 GGA GTA TCA GGA GCG GCT GCT ACT ACA GCA TCA AAT ACT GCA ACA AAA 574

Gly Val Ser Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ser Asn Thr Ala Thr Lys
 100 105 110
 ATT GCT ATG CAG ACC TCT ATT GAA GAG GCG AGC AAA AGT ATG GAG TCT 622

Ile Ala Met Gln Thr Ser Ile Glu Glu Ala Ser Lys Ser Met Glu Ser
 115 120 125
 ACC TTA GAG TCA CTT CAA AGC CTC AGT GCC GCG CAA ATG AAA GAA GTC 670

Thr Leu Glu Ser Leu Gln Ser Leu Ser Ala Ala Gln Met Lys Glu Val
 130 135 140 145
 GAA GCG GTT GTT GTT GCT GCC CTC TCA GGG AAA AGT TCG GGT TCC GCA 718

Glu Ala Val Val Val Ala Ala Leu Ser Gly Lys Ser Ser Gly Ser Ala
 150 155 160
 AAA TTG GAA ACA CCT GAG CTC CCC AAG CCC GGG GTG ACA CCA AGA TCA 766

Lys Leu Glu Thr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Gly Val Thr Pro Arg Ser
 165 170 175
 GAG GTT ATC GAA ATC GGA CTC GCG CTT GCT AAA GCA ATT CAG ACA TTG 814

Glu Val Ile Glu Ile Gly Leu Ala Leu Ala Lys Ala Ile Gln Thr Leu

180	185	190	
GGA GAA GCC ACA AAA TCT GCC TTA TCT AAC TAT GCA AGT ACA CAA GCA			862
Gly Glu Ala Thr Lys Ser Ala Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Thr Gln Ala			
195	200	205	
CAA GCA GAC CAA ACA AAT AAA CTA GGT CTA GAA AAG CAA GCG ATA AAA			910
Gln Ala Asp Gln Thr Asn Lys Leu Gly Leu Glu Lys Gln Ala Ile Lys			
210	215	220	225
ATC GAT AAA GAA CGA GAA GAA TAC CAA GAG ATG AAG GCT GCC GAA CAG			958
Ile Asp Lys Glu Arg Glu Glu Tyr Gln Glu Met Lys Ala Ala Glu Gln			
230	235	240	
AAG TCT AAA GAT CTC GAA GGA ACA ATG GAT ACT GTC AAT ACT GTG ATG			1006
Lys Ser Lys Asp Leu Glu Gly Thr Met Asp Thr Val Asn Thr Val Met			
245	250	255	
ATC GCG AAGGGGTTCCG AATTCCAGCT GAGCGCCGGT CGCTAC			1048
Ile Ala			
259			

配列番号 : 10

配列の長さ : 5702

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

配列の種類 : 他の核酸 プラスミド

配列

ATCGATGTTA ACAGATCTAA GCTTAACTAA CTAAGGAGGA ACTTCCATGA	60
--	----

TCAGTCTGAT TCGGGCGTTA GCGGTAGATC GCGTTATCGG CATGGAAAAC GCCATGCCGT 120

GGAACCTGCC TGCCGATCTC GCCTGGTTTA AACGCAACAC CTAAATAAA CCCGTGATTA 180

TGGGCCGCCA TACCTGGGAA TCAATCGGTC GTCCGTTGCC AGGACGCAA AATATTATCC 240

TCAGCAGTCA ACCGGGTACG GACGATCGCG TAACGTGGGT GAAGTCGGTG GATGAAGCCA 300

TCGCGGCGTG TGGTGACGTA CCAGAAATCA TGGTGATTGG CGGCGGTCCG GTTTATGAAC 360

AGTTCTTGCC AAAAGCGCAA AAAGTGTATC TGACGCATAT CGACGCAGAA GTGGAAGGCG 420

ACACCCATTT CCCGGATTAC GAGCCGGATG ACTGGGAATC GGTATTCAGC GAATTCCACG 480

ATGCTGATGC GCAGAACTCT CACAGCTATG AGTTCGAAAT TCTGGAGCGG CGGATCCAAT 540

TCGAACCCCT TCGCGGCTCT TTCTGGAAT CTAGAATCTT TACATCTCGA AGAGTTAACT 600

CAAGGATTAT TCCCTTCTGC CCAAGAAGAT GCCAACTTCG CAAAGGAGTT ATCTTCAGTA 660

GTACACGGAT TAAAAACCT AACCCTGTA GTTAATAAAC AAATGGTTAA AGGCGCTGAG 720

TAAAGCCCTT TGCAGAATCA AACCCCTTAG GATACAAACA TGTCTATTTC ATCTTCTTCA 780

GGACCTGACA ATCAAAAAA TATCATGTCT CAAGTTCTGA CATCGACACC CCAGGGCGTG 840

CCCCAACAAG ATAAGCTGTC TGGCAACGAA ACGAAGCAA TACAGCAAAC ACGTCAGGGT 900

AAAAA
AACTG AGATGGAAG CGATGCCACT ATTGCTGGTG CTTCTGGAAA AGACAAA
ACT 960

TCCTCGACTA CAAAAACAGA AACAGCTCCA CAACAGGGAG TTGCTGCTGG GAAAGAATCC 1020

TCAGAAAGTC AAAGGCAGG TGCTGATACT GGAGTATCAG GAGCGGCTGC TACTACAGCA 1080

TCAAATACTG CAACAAAAAT TGCTATGCAG ACCTCTATTG AAGAGGCGAG CAAAAGTATG 1140

GAGTCTACCT TAGAGTCACT TCAAAGCCTC AGTGCCGCGC AAATGAAAGA AGTCGAAGCG 1200

GTTGTTGTTG CTGCCCTCTC AGGGAAAAGT TCGGGTTCCG CAAAATTGGA AACACCTGAG 1260

CTCCCCAAGC CCGGGGTGAC ACCAAGATCA GAGGTTATCG AAATCGGACT CGCGCTTGCT 1320

AAAGCAATTC AGACATTGGG AGAAGCCACA AAATCTGCCT TATCTAACTA TGCAAGTACA 1380

CAAGCACAAG CAGACCAAAC AAATAAATA GGTCTAGAAA AGCAAGCGAT AAAATCGAT 1440

AAAGAACGAG AAGAATACCA AGAGATGAAG GCTGCCGAAC AGAAGTCTAA AGATCTCGAA 1500

GGAACAATGG ATACTGTCAA TACTGTGATG ATCGCGAAGG GGTTCGAATT GCCATGGGGG 1560

CCCTTAATTA ATTAATCGA GAGATCCAGA TCTAATCGAT GATCCTCTAC GCCGGACGCA 1620

TCGTGGCCGG CATCACCGGC GCCACAGGTG CGGTTGCTGG CGCCTATATC GCCGACATCA 1680

CCGATGGGGA AGATCGGGCT CGCCACTTCG GGCTCATGAG CGCTTGTTTC GGCGTGGGTA 1740

TGCTGGCAGG CCCGTGGCCG GGGGACTGTT GGGCGCCATC TCCTTGATG CACCATTCTT 1800

TGCGGCGGCG GTGCTCAACG GCCTCAACCT ACTACTGGGC TGCTTCCTAA TGCAGGAGTC 1860

GCATAAGGGA GAGCGTCGAC CGATGCCCTT GAGAGCCTTC AACCCAGTCA GCTCCTTCCG 1920

GTGGGCGGCG GGCATGACTA TCGTCGCCCG ACTTATGACT GTCTTCTTTA TCATGCAACT 1980

CGTAGGACAG GTGCCGGCAG CGCTCTGGGT CATTTTCGGC GAGGACCGCT TTCGCTGGAG 2040

CGCGACGATG ATCGGCCTGT CGCTTGGGGT ATTCGGAATC TTGCACGCCC TCGCTCAAGC 2100

CTTCGTCACT GGTCCCGCCA CCAAACGTTT CGGCGAGAAG CAGGCCATTA TCGCCGGCAT 2160

GGCGGCCGAC GCGCTGGGCT ACGTCTTGCT GCGGTTGCGG ACGCGAGGCT GGATGGCCTT 2220

CCCCATTATG ATTCTTCTCG CTTCGGGCGG CATCGGGATG CCCGCGTTGC AGGCCATGCT 2280

GTCCAGGCAG GTAGATGACG ACCATCAGGG ACAGCTTCAA GGATCGCTCG CGGCTCTTAC 2340

CAGCCTAACT TCGATCACTG GACCGCTGAT CGTCACGGCG ATTTATGCCG CCTCGGCGAG 2400

CACATGGAAC GGGTTGGCAT GGATTGTAGG CGCCGCCCTA TACCTTGTCT GCCTCCCCGC 2460

GTTGCGTCGC GGTGCATGGA GCCGGGCCAC CTCGACCTGA ATGGAAGCCG GCGGCACCTC 2520

GCTAACGGAT TCACCACTCC AAGAATTGGA GCCAATCAAT TCTTCCGGAG AACTGTGAAT 2580

GCGCAAACCA ACCCTTGGCA GAACATATCC ATCGCGTCCG CCATCTCCAG CAGCCGCACG 2640

CGGCGCATCT CGGGCAGCGT TGGGTCCTGG CCACGGGTGC GCATGATCGT GCTCCTGTCC 2700

TTGAGGACCC GGCTAGGCTG GCGGGGTTGC CTTACTGGTT AGCAGAATGA ATCACCGATA 2760

CGCGAGCGAA CGTGAAGCGA CTGCTGCTGC AAAACGTCTG CGACCTGAGC AACAACATGA 2820

ATGGTCTTCG GTTTCGGTGT TTCGTAAAGT CTGGAAACGC GGAAGTCAGC GCCCTGCACC 2880

ATTATGTTCC GGATCTGCAT CGCAGGATGC TGCTGGCTAC CCTGTGGAAC ACCTACATCT 2940

GTATTAACGA AGCGCTGGCA TTGACCCTGA GTGATTTTTC TCTGGTCCCG CCGCATCCAT 3000

ACCGCCAGTT GTTTACCCTC ACAACGTTCC AGTAACCGGG CATGTTTCATC ATCAGTAACC 3060

CGTATCGTGA GCATCCTCTC TCGTTTCATC GGTATCATTG CCCCCATGAA CAGAAATTC 3120

CCCCTTACAC GGAGGCATCA AGTGACCAA CAGGAAAAAA CCGCCCTTAA CATGGCCCG 3180

CTTTATCAGA AGCCAGACAT TAACGCTTCT GGAGAAACTC AACGAGCTGG ACGCGGATG 3240

AACAGGCAGA CATCTGTGAA TCGCTTCACG ACCACGCTGA TGAGCTTTAC CGCAGCTGC 3300

CTCGCGCGTT TCGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGT 3360

CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGG 3420

GTGTTGGCGG GTGTCGGGGC GCAGCCATGA CCCAGTCACG TAGCGATAGC GGAGTGTAT 3480

ACTGGCTTAA CTATCGGGCA TCAGAGCAGA TTGTA CTGAG AGTGCACCAT ATGCGGTGT 3540

GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA TACCGCATCA GCGGCTCTTC CGCTTCCTC 3600

GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTCGTTCC GCTGCGGCGA GCGGTATCAG CTCACTCAA 3660

AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCA 3720

AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAG 3780

GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GCGGAAACC 3840

CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCTCGTG CGCTCTCCT 3900

GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGC 3960

GCTTTCTCAA TGCTACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGC 4020

TGGGCTGTGT GCACGAACCC CCCGTTACG CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACAT 4080

CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAA 4140

CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTA 4200

ACTACGGCTA CACTAGAAGG ACAGTATTTG GTATCTGCCG TCTGCTGAAG CCAGTTACC 4260

TTCGGAAAAA GAGTTGCTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA CCACCGCTGG TAGCGGTGG 4320

TTTTTTTGTG TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG AAGATCCTT 4380

TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTAA GGGATTTTG 4440

GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAAAA ATGAAGTTT 4500

TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCA 4560

GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGAATCCCC 4620

GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC TTACCATCTG GCGCCAGTGC TGCAATGAT 4680

ACCGCGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAA 4740

GGGCGGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGT 4800

TGCCGGGAAG CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA GTTAATAGTT TCGGCAACGT TGTGCCAT 4860

TGCTGCAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTT 4920

CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCC 4980

TTCCGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCAG TGTTATCACT CATGGTTAT 5040

GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAATGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTG 5100

GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGTATGCG GCGACCGAGT TGCTCTTGC 5160

CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCAT 5220

TGAAAAACGT TCTTCGGGGC GAAACTCTC AAGGATCTTA CCGCTGTTGA GATCCAGTT 5280

CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTT 5340

TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAA AGGGAATAAG GCGGACACG 5400

GAAATGTTGA ATACTCATAC TCTTCCTTTT TCAATATTAT TGAAGCATTT ATCAGGGTT 5460

ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAACAA ATAGGGGTT 5520

CCGCGCACAT TTCCCGAAA AGTGCCACCT GACGTCTAAG AAACCATTAT TATCATGAC 5580

ATTAACCTAT AAAAATAGGC GTATCAGGAG GCCCTTTCGT CTTCAAGAAT TAATTGTTA 5640

TCCGCTCACA ATTAATTCTT GACAATTAGT TAACTATTTG TTATAATGTA TTCATAAGC 5700

TT 5702

配列番号 : 11

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GATCCAATTG CCATGGGGGC CCTTAATTAA TTAAC

35

配列番号 : 12

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

配列

TCGAGTTAAT TAATTAAGGG CCCCCATGGC AATTG

35

配列番号 : 13

配列の長さ : 1954

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : C.ニューモニエ

株名 : YK-41

直接の起源

クローン : 70-2S

配列の特徴

特徴を表す記号 : - 3 5 signal

存在位置 : 146..151

特徴を決定した方法 : S

配列の特徴

特徴を表す記号 : - 1 0 signal

存在位置 : 169..174

特徴を決定した方法 : S

配列の特徴

特徴を表す記号 : R B S

存在位置 : 199..205

特徴を決定した方法 : S

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 215..1927

特徴を決定した方法 : S

配列

TTGACACCAG ACCAACTGGT AATGGTAGCG ACCGGCGCTC AGCTGGAATT CGAACCCCTT 60

CGCCTTATAC ATCTCTAGAA CGGAAGTATA GGATTTTACG ATTAATTCGA TTATATAGAA 120

CTAATCGTCT CCTGCAAGGG AGGTCTTGCC TTTTTTAAGG TTTATATTTA CACTGTCTTT 180

TTTGACTTTG TAGTTTTTATG GAGAATAACA ATAA ATG CCA AAA CAA GCT GAA TAT 235

Met Pro Lys Gln Ala Glu Tyr

1

5

ACT TGG GGA TCT AAA AAA ATT CTG GAC AAT ATA GAA TGC CTC ACA GAA 283

Thr Trp Gly Ser Lys Lys Ile Leu Asp Asn Ile Glu Cys Leu Thr Glu

10

15

20

GAC GTT GCC GAA TTT AAA GAT TTG CTT TAT ACG GCA CAC AGA ATT ACT 331

Asp Val Ala Glu Phe Lys Asp Leu Leu Tyr Thr Ala His Arg Ile Thr

25

30

35

TCG AGC GAA GAA GAA TCT GAT AAC GAA ATA CAG CCT GGC GCC ATC CTA 379

Ser Ser Glu Glu Glu Ser Asp Asn Glu Ile Gln Pro Gly Ala Ile Leu

40

45

50

55

AAA GGT ACC GTA GTT GAT ATT AAT AAA GAC TTT GTC GTA GTT GAT GTT	427
Lys Gly Thr Val Val Asp Ile Asn Lys Asp Phe Val Val Val Asp Val	
60 65 70	
GGT CTG AAG TCT GAG GGA GTG ATC CCT ATG TCA GAG TTC ATA GAC TCT	475
Gly Leu Lys Ser Glu Gly Val Ile Pro Met Ser Glu Phe Ile Asp Ser	
75 80 85	
TCA GAA GGT TTA GTG CTT GGA GCT GAA GTA GAA GTC TAT CTC GAC CAA	523
Ser Glu Gly Leu Val Leu Gly Ala Glu Val Glu Val Tyr Leu Asp Gln	
90 95 100	
GCC GAA GAC GAA GAG GGC AAA GTT GTC CTT TCT AGA GAA AAA GCC ACA	571
Ala Glu Asp Glu Glu Gly Lys Val Val Leu Ser Arg Glu Lys Ala Thr	
105 110 115	
CGA CAA CGT CAA TGG GAA TAC ATC TTA GCT CAT TGT GAA GAA GGT TCT	619
Arg Gln Arg Gln Trp Glu Tyr Ile Leu Ala His Cys Glu Glu Gly Ser	
120 125 130 135	
ATT GTT AAA GGT CAA ATT ACA CGT AAA GTC AAA GGC GGC CTT ATT GTA	667
Ile Val Lys Gly Gln Ile Thr Arg Lys Val Lys Gly Gly Leu Ile Val	
140 145 150	
GAT Ile Gly Met Glu Ala Phe Leu Pro Gly Ser Gln Ile Asp Asn Lys	715
Asp ATT GGA ATG GAA GCC TTC CTA CCT GGA TCA CAA ATT GAC AAC AAG	
155 160 165	
Lys ATC AAA AAT TTA GAT GAT TAT GTC GGA AAA GTT TGT GAA TTC AAA	763

AAA Ile Lys Asn Leu Asp Asp Tyr Val Gly Lys Val Cys Glu Phe Lys
 170 175 180
 ATT TTA AAA ATT AAC GTT GAA CGT CGC AAT ATT GTT GTC TCA AGA AGA 811

 Ile Leu Lys Ile Asn Val Glu Arg Arg Asn Ile Val Val Ser Arg Arg
 185 190 195
 GAA CTC TTA GAA GCT GAG AGA ATC TCT AAG AAA GCC GAA CTT ATT GAA 859

 Glu Leu Leu Glu Ala Glu Arg Ile Ser Lys Lys Ala Glu Leu Ile Glu
 200 205 210 215
 CAA ATT TCT ATC GGA GAA TAC CGC AAA GGA GTT GTT AAA AAC ATT ACT 907

 Gln Ile Ser Ile Gly Glu Tyr Arg Lys Gly Val Val Lys Asn Ile Thr
 220 225 230
 GAC TTT GGT GTA TTC TTA GAT CTC GAT GGT ATT GAC GGT CTT CTC CAC 955

 Asp Phe Gly Val Phe Leu Asp Leu Asp Gly Ile Asp Gly Leu Leu His
 235 240 245
 ATT ACC GAT ATG ACC TGG AAG CGC ATA CGA CAT CCT TCC GAA ATG GTC 1003

 Ile Thr Asp Met Thr Trp Lys Arg Ile Arg His Pro Ser Glu Met Val
 250 255 260
 GAA TTG AAT CAA GAG TTG GAA GTA ATT ATT TTA ACC GTA GAT AAA GAA 1051

 Glu Leu Asn Gln Glu Leu Glu Val Ile Ile Leu Ser Val Asp Lys Glu
 265 270 275
 AAA GGA CGA GTT GCT CTA GGT CTC AAA CAA AAA GAG CAT AAT CCT TGG 1099

Lys Gly Arg Val Ala Leu Gly Leu Lys Gln Lys Glu His Asn Pro Trp
 280 285 290 295
 GAA GAT ATT GAG AAG AAA TAC CCT CCT GGA AAA CGA GTT CTT GGT AAA 1147

Glu Asp Ile Glu Lys Lys Tyr Pro Pro Gly Lys Arg Val Leu Gly Lys
 300 305 310
 ATT GTG AAG CTT CTC CCC TAC GGA GCT TTC ATT GAA ATT GAA GAG GGC 1195

Ile Val Lys Leu Leu Pro Tyr Gly Ala Phe Ile Glu Ile Glu Glu Gly
 315 320 325
 ATT GAA GGT CTA ATT CAC ATT TCT GAA ATG TCT TGG GTG AAA AAT ATT 1243

Ile Glu Gly Leu Ile His Ile Ser Glu Met Ser Trp Val Lys Asn Ile
 330 335 340
 GTA GAT CCT AGT GAA GTC GTA AAT AAA GGC GAT GAA GTT GAA GCC ATT 1291

Val Asp Pro Ser Glu Val Val Asn Lys Gly Asp Glu Val Glu Ala Ile
 345 350 355
 GTT CTA TCT ATT CAG AAG GAC GAA GGA AAA ATT TCT CTA GGA TTA AAG 1339

Val Leu Ser Ile Gln Lys Asp Glu Gly Lys Ile Ser Leu Gly Leu Lys
 360 365 370 375
 CAA ACA GAA CGT AAT CCT TGG GAC AAT ATC GAA GAA AAA TAT CCT ATA 1387

Gln Thr Glu Arg Asn Pro Trp Asp Asn Ile Glu Glu Lys Tyr Pro Ile
 380 385 390
 GGT CTC CAT GTC AAT GCT GAA ATC AAG AAC TTA ACC AAT TAC GGT GCT 1435

Gly Leu His Val Asn Ala Glu Ile Lys Asn Leu Thr Asn Tyr Gly Ala

395	400	405	
TTC GTT GAA TTA GAA CCA GGA ATT GAG GGT CTG ATT CAT ATT TCT GAC			1483
Phe Val Glu Leu Glu Pro Gly Ile Glu Gly Leu Ile His Ile Ser Asp			
410	415	420	
ATG AGT TGG ATT AAA AAA GTC TCT CAC CCT TCA GAA CTA TTC AAA AAA			1531
Met Ser Trp Ile Lys Lys Val Ser His Pro Ser Glu Leu Phe Lys Lys			
425	430	435	
GGA AAT TCT GTA GAG GCT GTT ATT TTA TCA GTA GAC AAA GAA AGT AAA			1579
Gly Asn Ser Val Glu Ala Val Ile Leu Ser Val Asp Lys Glu Ser Lys			
440	445	450	455
AAA ATT ACT TTA GGA GTT AAG CAA TTA AGT TCT AAT CCT TGG AAT GAA			1627
Lys Ile Thr Leu Gly Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Pro Trp Asn Glu			
460	465	470	
ATT GAA GCT ATG TTC CCT GCT GGC ACA GTA ATT TCA GGA GTT GTG ACT			1675
Ile Glu Ala Met Phe Pro Ala Gly Thr Val Ile Ser Gly Val Val Thr			
475	480	485	
AAA ATC ACT GCA TTT GGA GCC TTT GTT GAG CTA CAA AAC GGG ATT GAA			1723
Lys Ile Thr Ala Phe Gly Ala Phe Val Glu Leu Gln Asn Gly Ile Glu			
490	495	500	
GGA TTG ATT CAC GTT TCA GAA CTT TCT GAC AAG CCC TTT GCA AAA ATT			1771
Gly Leu Ile His Val Ser Glu Leu Ser Asp Lys Pro Phe Ala Lys Ile			
505	510	515	

GAA GAT ATT ATC TCC ATT GGA GAA AAT GTT TCT GCA AAA GTA ATT AAG 1919

Glu Asp Ile Ile Ser Ile Gly Glu Asn Val Ser Ala Lys Val Ile Lys

520 525 530 535

CTA GAT CCA GAT CAT AAA AAA GTT TCT CTT TCT GTA AAA GAA TAC TTA 1867

Leu Asp Pro Asp His Lys Lys Val Ser Leu Ser Val Lys Glu Tyr Leu

540 545 550

GCT GAC AAT GCT TAT GAT CAA GAC TCT AGG ACT GAA TTA GAT TTC AAG 1915

Ala Asp Asn Ala Tyr Asp Gln Asp Ser Arg Thr Glu Leu Asp Phe Lys

555 560 565

GAT TCT CAA GGC GAA GGG GTT CGA ATT CCG CCG ATA CTG 1954

Asp Ser Gln Gly Glu Gly Val Arg Ile Pro Pro Ile Leu

570 575 580

配列番号 : 14

配列の長さ : 160

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly Met

1 5 10 15

Glu Asn Ala Met Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp Phe Lys

20 25 30

Arg Asn Thr Leu Asn Lys Pro Val Ile Met Gly Arg His Thr Trp Glu

35 40 45

Ser Ile Gly Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile Ile Leu Ser Ser

50	55	60
Gln Pro Gly Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val Lys Ser Val Asp Glu		
65	70	75 80
Ala Ile Ala Ala Cys Gly Asp Val Pro Glu Ile Met Val Ile Gly Gly		
85	90	95
Gly Arg Val Tyr Glu Gln Phe Leu Pro Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu		
100	105	110
Thr His Ile Asp Ala Glu Val Glu Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr		
115	120	125
Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp		
130	135	140
Ala Gln Asn Ser His Ser Tyr Glu Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg Ile		
145	150	155 160

配列番号 : 15

配列の長さ : 649

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly Met
1 5 10 15
Glu Asn Ala Met Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp Phe Lys
20 25 30
Arg Asn Thr Leu Asn Lys Pro Val Ile Met Gly Arg His Thr Trp Glu
35 40 45
Ser Ile Gly Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile Ile Leu Ser Ser
50 55 60
Gln Pro Gly Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val Lys Ser Val Asp Glu
65 70 75 80

Ala Ile Ala Ala Cys Gly Asp Val Pro Glu Ile Met Val Ile Gly Gly
 85 90 95
 Gly Arg Val Tyr Glu Gln Phe Leu Pro Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu
 100 105 110
 Thr His Ile~Asp Ala Glu Val Glu Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr
 115 120 125
 Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp
 130 135 140
 Ala Gln Asn Ser His Ser Tyr Glu Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg Ile
 145 150 155 160
 Leu Met Ser Ile Ser Ser Ser Ser Gly Pro Asp Asn Gln Lys Asn Ile
 165 170 175
 Met Ser Gln Val Leu Thr Ser Thr Pro Gln Gly Val Pro Gln Gln Asp
 180 185 190
 Lys Leu Ser Gly Asn Glu Thr Lys Gln Ile Gln Gln Thr Arg Gln Gly
 195 200 205
 Lys Asn Thr Glu Met Glu Ser Asp Ala Thr Ile Ala Gly Ala Ser Gly
 210 215 220
 Lys Asp Lys Thr Ser Ser Thr Thr Lys Thr Glu Thr Ala Pro Gln Gln
 225 230 235 240
 Gly Val Ala Ala Gly Lys Glu Ser Ser Glu Ser Gln Lys Ala Gly Ala
 245 250 255
 Asp Thr Gly Val Ser Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ser Asn Thr Ala
 260 265 270
 Thr Lys Ile Ala Met Gln Thr Ser Ile Glu Glu Ala Ser Lys Ser Met
 275 280 285
 Glu Ser Thr Leu Glu Ser Leu Gln Ser Leu Ser Ala Ala Gln Met Lys
 290 295 300
 Glu Val Glu Ala Val Val Val Ala Ala Leu Ser Gly Lys Ser Ser Gly

305	310	315	320
Ser Ala Lys Leu Glu Thr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Gly Val Thr Pro			
325	330	335	
Arg Ser Glu Val Ile Glu Ile Gly Leu Ala Leu Ala Lys Ala Ile Gln			
340	345	350	
Thr Leu Gly Glu Ala Thr Lys Ser Ala Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Thr			
355	360	365	
Gln Ala Gln Ala Asp Gln Thr Asn Lys Leu Gly Leu Glu Lys Gln Ala			
370	375	380	
Ile Lys Ile Asp Lys Glu Arg Glu Glu Tyr Gln Glu Met Lys Ala Ala			
385	390	395	400
Glu Gln Lys Ser Lys Asp Leu Glu Gly Thr Met Asp Thr Val Asn Thr			
405	410	415	
Val Met Ile Ala Val Ser Val Ala Ile Thr Val Ile Ser Ile Val Ala			
420	425	430	
Ala Ile Phe Thr Cys Gly Ala Gly Leu Ala Gly Leu Ala Ala Gly Ala			
435	440	445	
Ala Val Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Ala			
450	455	460	
Thr Thr Val Ala Thr Gln Ile Thr Val Gln Ala Val Val Gln Ala Val			
465	470	475	480
Lys Gln Ala Val Ile Thr Ala Val Arg Gln Ala Ile Thr Ala Ala Ile			
485	490	495	
Lys Ala Ala Val Lys Ser Gly Ile Lys Ala Phe Ile Lys Thr Leu Val			
500	505	510	
Lys Ala Ile Ala Lys Ala Ile Ser Lys Gly Ile Ser Lys Val Phe Ala			
515	520	525	
Lys Gly Thr Gln Met Ile Ala Lys Asn Phe Pro Lys Leu Ser Lys Val			
530	535	540	

Ile Ser Ser Leu Thr Ser Lys Trp Val Thr Val Gly Val Gly Val Val
 545 550 555 560
 Val Ala Ala Pro Ala Leu Gly Lys Gly Ile Met Gln Met Gln Leu Ser
 565 570 575
 Glu Met Gln Gln Asn Val Ala Gln Phe Gln Lys Glu Val Gly Lys Leu
 580 585 590
 Gln Ala Ala Ala Asp Met Ile Ser Met Phe Thr Gln Phe Trp Gln Gln
 595 600 605
 Ala Ser Lys Ile Ala Ser Lys Gln Thr Gly Glu Ser Asn Glu Met Thr
 610 615 620
 Gln Lys Ala Thr Lys Leu Gly Ala Gln Ile Leu Lys Ala Tyr Ala Ala
 625 630 635 640
 Ile Ser Gly Ala Ile Ala Gly Ala Ala
 645 649

配列番号 : 16

配列の長さ : 432

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly Met
 1 5 10 15
 Glu Asn Ala Met Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp Phe Lys
 20 25 30
 Arg Asn Thr Leu Asn Lys Pro Val Ile Met Gly Arg His Thr Trp Glu
 35 40 45
 Ser Ile Gly Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile Ile Leu Ser Ser
 50 55 60
 Gln Pro Gly Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val Lys Ser Val Asp Glu

65	70	75	80
Ala Ile Ala Ala Cys Gly Asp Val Pro Glu Ile Met Val Ile Gly Gly			
85	90	95	
Gly Arg Val Tyr Glu Gln Phe Leu Pro Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu			
100	105	110	
Thr His Ile Asp Ala Glu Val Glu Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr			
115	120	125	
Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp			
130	135	140	
Ala Gln Asn Ser His Ser Tyr Glu Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg Ile			
145	150	155	160
Leu Met Ser Ile Ser Ser Ser Ser Gly Pro Asp Asn Gln Lys Asn Ile			
165	170	175	
Met Ser Gln Val Leu Thr Ser Thr Pro Gln Gly Val Pro Gln Gln Asp			
180	185	190	
Lys Leu Ser Gly Asn Glu Thr Lys Gln Ile Gln Gln Thr Arg Gln Gly			
195	200	205	
Lys Asn Thr Glu Met Glu Ser Asp Ala Thr Ile Ala Gly Ala Ser Gly			
210	215	220	
Lys Asp Lys Thr Ser Ser Thr Thr Lys Thr Glu Thr Ala Pro Gln Gln			
225	230	235	240
Gly Val Ala Ala Gly Lys Glu Ser Ser Glu Ser Gln Lys Ala Gly Ala			
245	250	255	
Asp Thr Gly Val Ser Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ser Asn Thr Ala			
260	265	270	
Thr Lys Ile Ala Met Gln Thr Ser Ile Glu Glu Ala Ser Lys Ser Met			
275	280	285	
Glu Ser Thr Leu Glu Ser Leu Gln Ser Leu Ser Ala Ala Gln Met Lys			
290	295	300	

Glu Val Glu Ala Val Val Val Ala Ala Leu Ser Gly Lys Ser Ser Gly
 305 310 315 320
 Ser Ala Lys Leu Glu Thr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Gly Val Thr Pro
 325 330 335
 Arg Ser Glu Val Ile Glu Ile Gly Leu Ala Leu Ala Lys Ala Ile Gln
 340 345 350
 Thr Leu Gly Glu Ala Thr Lys Ser Ala Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Thr
 355 360 365
 Gln Ala Gln Ala Asp Gln Thr Asn Lys Leu Gly Leu Glu Lys Gln Ala
 370 375 380
 Ile Lys Ile Asp Lys Glu Arg Glu Glu Tyr Gln Glu Met Lys Ala Ala
 385 390 395 400
 Glu Gln Lys Ser Lys Asp Leu Glu Gly Thr Met Asp Thr Val Asn Thr
 405 410 415
 Val Met Ile Ala Lys Gly Phe Glu Leu Pro Trp Gly Pro Leu Ile Asn
 420 425 430 432

配列番号 : 17

配列の長さ : 1947

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ATG ATC AGT CTG ATT GCG GCG TTA GCG GTA GAT CGC GTT ATC GGC ATG 48

Met Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly Met

1

5

10

15

GAA AAC GCC ATG CCG TGG AAC CTG CCT GCC GAT CTC GCC TGG TTT AAA 96

Glu Asn Ala Met Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp Phe Lys	
20 25 30	
CGC AAC ACC TTA AAT AAA CCC GTG ATT ATG GGC CGC CAT ACC TGG GAA	144
Arg Asn Thr Leu Asn Lys Pro Val Ile Met Gly Arg His Thr Trp Glu	
35 40 45	
TCA ATC GGT CGT CCG TTG CCA GGA CGC AAA AAT ATT ATC CTC AGC AGT	192
Ser Ile Gly Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile Ile Leu Ser Ser	
50 55 60	
CAA CCG GGT ACG GAC GAT CGC GTA ACG TGG GTG AAG TCG GTG GAT GAA	240
Gln Pro Gly Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val Lys Ser Val Asp Glu	
65 70 75 80	
GCC ATC GCG GCG TGT GGT GAC GTA CCA GAA ATC ATG GTG ATT GGC GGC	288
Ala Ile Ala Ala Cys Gly Asp Val Pro Glu Ile Met Val Ile Gly Gly	
85 90 95	
GGT CGC GTT TAT GAA CAG TTC TTG CCA AAA GCG CAA AAA CTG TAT CTG	336
Gly Arg Val Tyr Glu Gln Phe Leu Pro Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu	
100 105 110	
ACG CAT ATC GAC GCA GAA GTG GAA GGC GAC ACC CAT TTC CCG GAT TAC	384
Thr His Ile Asp Ala Glu Val Glu Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr	
115 120 125	
GAG CCG GAT GAC TGG GAA TCG GTA TTC AGC GAA TTC CAC GAT GCT GAT	432
Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp	

130	135	140	
CGG CAG AAC TCT CAC AGC TAT GAG TTC GAA ATT CTG GAG CGG CGG ATC			480
Ala Gln Asn Ser His Ser Tyr Glu Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg Ile			
145	150	155	160
CTG ATG TCT ATT TCA TCT TCT TCA GGA CCT GAC AAT CAA AAA AAT ATC			528
Leu Met Ser Ile Ser Ser Ser Ser Gly Pro Asp Asn Gln Lys Asn Ile			
165	170	175	
ATG TCT CAA GTT CTG ACA TCG ACA CCC CAG GGC GTG CCC CAA CAA GAT			576
Met Ser Gln Val Leu Thr Ser Thr Pro Gln Gly Val Pro Gln Gln Asp			
180	185	190	
AAG CTG TCT GGC AAC GAA ACG AAG CAA ATA CAG CAA ACA CGT CAG GGT			624
Lys Leu Ser Gly Asn Glu Thr Lys Gln Ile Gln Gln Thr Arg Gln Gly			
195	200	205	
AAA AAC ACT GAG ATG GAA AGC GAT GCC ACT ATT GCT GGT GCT TCT GGA			672
Lys Asn Thr Glu Met Glu Ser Asp Ala Thr Ile Ala Gly Ala Ser Gly			
210	215	220	
AAA GAC AAA ACT TCC TCG ACT ACA AAA ACA GAA ACA GCT CCA CAA CAG			720
Lys Asp Lys Thr Ser Ser Thr Thr Lys Thr Glu Thr Ala Pro Gln Gln			
225	230	235	240
GGA GTT GCT GCT GGG AAA GAA TCC TCA GAA ACT CAA AAG GCA GGT GCT			768
Gly Val Ala Ala Gly Lys Glu Ser Ser Glu Ser Gln Lys Ala Gly Ala			
245	250	255	

GAT ACT GGA GTA TCA GGA GCG GCT GCT ACT ACA GCA TCA AAT ACT GCA	816
Asp Thr Gly Val Ser Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ser Asn Thr Ala	
260 265 270	
ACA AAA ATT GCT ATG CAG ACC TCT ATT GAA GAG GCG AGC AAA AGT ATG	864
Thr Lys Ile Ala Met Gln Thr Ser Ile Glu Glu Ala Ser Lys Ser Met	
275 280 285	
GAG TCT ACC TTA GAG TCA CTT CAA AGC CTC AGT GCC GCG CAA ATG AAA	912
Glu Ser Thr Leu Glu Ser Leu Gln Ser Leu Ser Ala Ala Gln Met Lys	
290 295 300	
GAA GTC GAA GCG GTT GTT GTT GCT GCC CTC TCA GGG AAA AGT TCG GGT	960
Glu Val Glu Ala Val Val Val Ala Ala Leu Ser Gly Lys Ser Ser Gly	
305 310 315 320	
TCC GCA AAA TTG GAA ACA CCT GAG CTC CCC AAG CCC GGG GTG ACA CCA	1008
Ser Ala Lys Leu Glu Thr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Gly Val Thr Pro	
325 330 335	
AGA TCA GAG GTT ATC GAA ATC GGA CTC GCG CTT GCT AAA GCA ATT CAG	1056
Arg Ser Glu Val Ile Glu Ile Gly Leu Ala Leu Ala Lys Ala Ile Gln	
340 345 350	
ACA TTG GGA GAA GCC ACA AAA TCT GCC TTA TCT AAC TAT GCA AGT ACA	1104
Thr Leu Gly Glu Ala Thr Lys Ser Ala Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Thr	
355 360 365	
CAA GCA CAA GCA GAC CAA ACA AAT AAA CTA GGT CTA GAA AAG CAA GCG	1152

1 0 1

Lys Gln Ala Val Ile Thr Ala Val Arg Gln Ala Ile Thr Ala Ala Ile	
485 490 495	
AAA GCG GCT GTC AAA TCT GGA ATA AAA GCA TTT ATC AAA ACT TTA GTC	1536
Lys Ala Ala Val Lys Ser Gly Ile Lys Ala Phe Ile Lys Thr Leu Val	
500 505 510	
AAA GCG ATT GCC AAA GCC ATT TCT AAA GGA ATC TCT AAG GTT TTC GCT	1584
Lys Ala Ile Ala Lys Ala Ile Ser Lys Gly Ile Ser Lys Val Phe Ala	
515 520 525	
AAG GGA ACT CAA ATG ATT GCG AAG AAC TTC CCC AAG CTC TCG AAA GTC	1632
Lys Gly Thr Gln Met Ile Ala Lys Asn Phe Pro Lys Leu Ser Lys Val	
530 535 540	
ATC TCG TCT CTT ACC AGT AAA TGG GTC ACG GTT GGG GTT GGG GTT GTA	1680
Ile Ser Ser Leu Thr Ser Lys Trp Val Thr Val Gly Val Gly Val Val	
545 550 555 560	
GTT GCG GCG CCT GCT CTC GGT AAA GGG ATT ATG CAA ATG CAG CTC TCG	1728
Val Ala Ala Pro Ala Leu Gly Lys Gly Ile Met Gln Met Gln Leu Ser	
565 570 575	
GAG ATG CAA CAA AAC GTC GCT CAA TTT CAG AAA GAA GTC GGA AAA CTG	1776
Glu Met Gln Gln Asn Val Ala Gln Phe Gln Lys Glu Val Gly Lys Leu	
580 585 590	
CAG GCT GCG GCT GAT ATG ATT TCT ATG TTC ACT CAA TTT TGG CAA CAG	1824
Gln Ala Ala Ala Asp Met Ile Ser Met Phe Thr Gln Phe Trp Gln Gln	

595	600	605	
GCA AGT AAA ATT GCC TCA AAA CAA ACA GGC GAG TCT AAT GAA ATG ACT			1872
Ala Ser Lys Ile Ala Ser Lys Gln Thr Gly Glu Ser Asn Glu Met Thr			
610	615	620	
CAA AAA GCT ACC AAG CTG GGC GCT CAA ATC CTT AAA GCG TAT GCC GCA			1920
Gln Lys Ala Thr Lys Leu Gly Ala Gln Ile Leu Lys Ala Tyr Ala Ala			
625	630	635	640
ATC AGC GGA GCC ATC GCT GGC GCA GCA			1947
Ile Ser Gly Ala Ile Ala Gly Ala Ala			
645	649		

配列番号 : 18

配列の長さ : 1296

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ATG ATC AGT CTG ATT GCG GCG TTA GCG GTA GAT CGC GTT ATC GGC ATG	48
Met Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly Met	
1	5
10	15
GAA AAC GCC ATG CCG TGG AAC CTG CCT GCC GAT CTC GCC TGG TTT AAA	96
Glu Asn Ala Met Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp Phe Lys	
20	25
30	
CGC AAC ACC TTA AAT AAA CCC GTG ATT ATG GGC CGC CAT ACC TGG GAA	144

Arg Asn Thr Leu Asn Lys Pro Val Ile Met Gly Arg His Thr Trp Glu	
35 40 45	
TCA ATC GGT CGT CCG TTG CCA GGA CGC AAA AAT ATT ATC CTC AGC AGT	192
Ser Ile Gly Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile Ile Leu Ser Ser	
50 55 60	
CAA CCG GGT ACG GAC GAT CGC GTA ACG TGG GTG AAG TCG GTG GAT GAA	240
Gln Pro Gly Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val Lys Ser Val Asp Glu	
65 70 75 80	
GCC ATC GCG GCG TGT GGT GAC GTA CCA GAA ATC ATG GTG ATT GGC GGC	288
Ala Ile Ala Ala Cys Gly Asp Val Pro Glu Ile Met Val Ile Gly Gly	
85 90 95	
GGT CGC GTT TAT GAA CAG TTC TTG CCA AAA GCG CAA AAA CTG TAT CTG	336
Gly Arg Val Tyr Glu Gln Phe Leu Pro Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu	
100 105 110	
ACG CAT ATC GAC GCA GAA GTG GAA GGC GAC ACC CAT TTC CCG GAT TAC	384
Thr His Ile Asp Ala Glu Val Glu Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr	
115 120 125	
GAG CCG GAT GAC TGG GAA TCG GTA TTC AGC GAA TTC CAC GAT GCT GAT	432
Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp	
130 135 140	
CGG CAG AAC TCT CAC AGC TAT GAG TTC GAA ATT CTG GAG CCG CCG ATC	480

Ala Gln Asn Ser His Ser Tyr Glu Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg Ile
 145 150 155 160
 CTG ATG TCT ATT TCA TCT TCT TCA GGA CCT GAC AAT CAA AAA AAT ATC 528

Leu Met Ser Ile Ser Ser Ser Ser Gly Pro Asp Asn Gln Lys Asn Ile
 165 170 175
 ATG TCT CAA GTT CTG ACA TCG ACA CCC CAG GGC GTG CCC CAA CAA GAT 576

Met Ser Gln Val Leu Thr Ser Thr Pro Gln Gly Val Pro Gln Gln Asp
 180 185 190
 AAG CTG TCT GGC AAC GAA ACG AAG CAA ATA CAG CAA ACA CGT CAG GGT 624

Lys Leu Ser Gly Asn Glu Thr Lys Gln Ile Gln Gln Thr Arg Gln Gly
 195 200 205
 AAA AAC ACT GAG ATG GAA AGC GAT GCC ACT ATT GCT GGT GCT TCT GGA 672

Lys Asn Thr Glu Met Glu Ser Asp Ala Thr Ile Ala Gly Ala Ser Gly
 210 215 220
 AAA GAC AAA ACT TCC TCG ACT ACA AAA ACA GAA ACA GCT CCA CAA CAG 720

Lys Asp Lys Thr Ser Ser Thr Thr Lys Thr Glu Thr Ala Pro Gln Gln
 225 230 235 240
 GGA GTT GCT GCT GGG AAA GAA TCC TCA GAA AGT CAA AAG GCA GGT GCT 768

Gly Val Ala Ala Gly Lys Glu Ser Ser Glu Ser Gln Lys Ala Gly Ala
 245 250 255
 GAT ACT GGA GTA TCA GGA GCG GCT GCT ACT ACA GCA TCA AAT ACT GCA 816

Asp Thr Gly Val Ser Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ser Asn Thr Ala

260	265	270	
ACA AAA ATT GCT ATG CAG ACC TCT ATT GAA GAG GCG AGC AAA AGT ATG			864
Thr Lys Ile Ala Met Gln Thr Ser Ile Glu Glu Ala Ser Lys Ser Met			
275	280	285	
GAG TCT ACC TTA GAG TCA CTT CAA AGC CTC AGT GCC GCG CAA ATG AAA			912
Glu Ser Thr Leu Glu Ser Leu Gln Ser Leu Ser Ala Ala Gln Met Lys			
290	295	300	
GAA GTC GAA GCG GTT GTT GTT GCT GCC CTC TCA GGG AAA AGT TCG GGT			960
Glu Val Glu Ala Val Val Val Ala Ala Leu Ser Gly Lys Ser Ser Gly			
305	310	315	320
TCC GCA AAA TTG GAA ACA CCT GAG CTC CCC AAG CCC GGG GTG ACA CCA			1008
Ser Ala Lys Leu Glu Thr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Gly Val Thr Pro			
325	330	335	
AGA TCA GAG GTT ATC GAA ATC GGA CTC GCG CTT GCT AAA GCA ATT CAG			1056
Arg Ser Glu Val Ile Glu Ile Gly Leu Ala Leu Ala Lys Ala Ile Gln			
340	345	350	
ACA TTG GCA GAA GCC ACA AAA TCT GCC TTA TCT AAC TAT GCA AGT ACA			1104
Thr Leu Gly Glu Ala Thr Lys Ser Ala Leu Ser Asn Tyr Ala Ser Thr			
355	360	365	
CAA GCA CAA GCA GAC CAA ACA AAT AAA CTA GGT CTA GAA AAG CAA GCG			1152
Gln Ala Gln Ala Asp Gln Thr Asn Lys Leu Gly Leu Glu Lys Gln Ala			
370	375	380	

ATA AAA ATC GAT AAA GAA CGA GAA GAA TAC CAA GAG ATG AAG GCT GCC 1200

Ile Lys Ile Asp Lys Glu Arg Glu Glu Tyr Gln Glu Met Lys Ala Ala
385 390 395 400

GAA CAG AAT TCT AAA GAT CTC GAA GGA ACA ATG GAT ACT GTC AAT ACT 1248

Glu Gln Lys Ser Lys Asp Leu Glu Gly Thr Met Asp Thr Val Asn Thr
405 410 415

GTG ATG ATC GCG AAG GGG TTC GAA TTG CCA TGG GGG CCC TTA ATT AAT 1296

Val Met Ile Ala Lys Gly Phe Glu Leu Pro Trp Gly Pro Leu Ile Asn
420 425 430 432

配列番号 : 19

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AGCTGTCTGG CAACGAAACG

20

配列番号 : 20

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCAGCAACAA CAACCGCTTC

20

配列番号 : 21

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GATCCTGATG TCTATTTTCAT CTTCTTCAG

29

配列番号 : 22

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GTCCTGAAGA AGATGAAATA GACATCAG

28

配列番号 : 23

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AATTGCCATG GGGGCCCTTA ATTAATTAAC

30

配列番号 : 24

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TCGAGTTAAT TAATTAAGGG CCCCCATGGC

30

配列番号 : 25

配列の長さ : 5438

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

配列の種類 : 他の核酸 プラスミド

配列

ATCGATGTTA ACAGATCTAA GCTTAACTAA CTAATCCGG AAAAGGAGGA ACTTCCATGA 60

TCAGTCTGAT TCGGGCGTTA GCGGTAGATC GCGTTATCGG CATGGAAAAC GCCATGCCGT 120

GGAACCTGCC TGCCGATCTC GCCTGGTTTA AACGCAACAC CTAAATAAA CCCGTGATTA 180

TGGGCCGCCA TACCTGGGAA TCAATCGGTC GTCCGTTGCC AGGACGCAA AATATTATCC 240

TCAGCAGTCA ACCGGGTACG GACGATCGCG TAACGTGGGT GAAGTCGGTG GATGAAGCCA 300

TCGCGGCGTG TGGTGACGTA CCAGAAATCA TGGTGATTGG CGGCGGTCGC GTTTATGAAC 360

AGTTCTTGCC AAAAGCGCAA AAATGTATC TGACGCATAT CGACGCAGAA GTGGAAGGCC 420

ACACCCATTT CCCGGATTAC GAGCCGGATG ACTGGGAATC GGTATTACGC GAATTCCACG 480

ATGCTGATGC GCAGAACTCT CACAGCTATG AGTTCGAAAT TCTGGAGCGG CGGATCCTGA 540

TGTCTATTTT ATCTTCTTCA GGACCTGACA ATCAAAAAA TATCATGTCT CAAGTTCTGA 600

CATCGACACC CCAGGGCGTG CCCCAACAAG ATAAGCTGTC TGGCAACGAA ACGAAGCAAA 660

TACAGCAAAC ACGTCAGGGT AAAAACAATG AGATGGAAG CGATGCCACT ATTGCTGGTG 720

CTTCTGGAAA AGACAAAAT TCCTCGACTA CAAAAACAGA AACAGCTCCA CAACAGGGAG 780

TTGCTGCTGG GAAAGAATCC TCAGAAAGTC AAAAGGCAGG TGCTGATACT GGAGTATCAG 840

GAGCGGCTGC TACTACAGCA TCAAATACTG CAACAAAAAT TGCTATGCAG ACCTCTATTG 900

AAGAGGCGAG CAAAAGTATG GAGTCTACCT TAGAGTCACT TCAAAGCCTC AGTGCCGCGC 960

AAATGAAAGA AGTCGAAGCG GTTGTGTGTTG CTGCCCTCTC AGGGAAGAGT TCGGGTTCCG 1020

CAAAATTGGA AACACCTGAG CTCCCCAAGC CCGGGGTGAC ACCAAGATCA GAGGTTATCG 1080

AAATCGGACT CGCGCTTGCT AAAGCAATTC AGACATTGGG AGAAGCCACA AAATCTGCCT 1140

TATCTAACTA TGCAAGTACA CAAGCACAAG CAGACCAAAC AAATAAACTA GGTCTAGAAA 1200

AGCAAGCGAT AAAAATCGAT AAAGAACGAG AAGAATACCA AGAGATGAAG GCTGCCGAAC 1260

AGAAGTCTAA AGATCTCGAA GGAACAATGG ATACTGTCAA TACTGTGATG ATCGCGAAGC 1320

GGTTGGAATT GCCATGGGGG CCCTTAATTA ATTAAC TCGA GAGATCCAGA TCTAATCGAT 1380

GATCCTCTAC GCCGGACGCA TCGTGGCCGG CATCACCGGC GCCACAGGTG CGGTTGCTGG 1440

CGCCTATATC GCCGACATCA CCGATGGGGA AGATCGGGCT CGCCACTTCG GGCTCATGAG 1500

CGCTTGTTTC GCGGTGGGTA TGGTGGCAGG CCCGTGGCCG GGGGACTGTT GGGCGCCATC 1560

TCCTTG CATG CACCATTCTT TCGGGCGGGC GTGCTCAACG GCCTCAACCT ACTACTGGGC 1620

TGCTTCCTAA TGCAGGAGTC GCATAAGGGA GAGCGTCGAC CGATGCCCTT GAGAGCCTTC 1680

AACCCAGTCA GCTCCTTCCG GTGGGCGCGG GGCATGACTA TCGTCGCCGC ACTTATGACT 1740

GTCTTCTTTA TCATGCAACT CGTAGGACAG GTGCCGGCAG CGCTCTGGGT CATTTTCGGC 1800

GAGGACCGCT TTCGCTGGAG CCGGACGATG ATCGGCCTGT CGCTTGCGGT ATTCGGAATC 1860

TTGCACGCCC TCGCTCAAGC CTTCGTCACT GGTCCCGCCA CCAAACGTTT CGGCGAGAAG 1920

CAGGCCATTA TCGCCGGCAT GCGGGCCGAC GCGCTGGGCT ACGTCTTGCT GCGGTTCCGG 1980

ACGCGAGGCT GGATGGCCTT CCCCATTATG ATTCTTCTCG CTTCCGGCGG CATCGGGATG 2040

CCCGCGTTGC AGGCCATGCT GTCCAGGCAG GTAGATGACG ACCATCAGGG ACAGCTTCAA 2100

GGATCGCTCG CCGCTCTTAC CAGCCTAACT TCGATCACTG GACCGCTGAT CGTCACGGCG 2160

ATTATATGCCG CCTCGGCGAG CACATGGAAC GGGTTGGCAT GGATTGTAGG CGCCGCCCTA 2220

TACCTTGTCT GCCTCCCCGC GTTGGCTCGC GGTGCATGGA GCCGGGCCAC CTCGACCTGA 2280

ATGGAAGCCG GCGGCACCTC GCTAACGGAT TCACCACTCC AAGAATTGGA GCCAATCAAT 2340

TCTTGCGGAG AACTGTGAAT GCGCAAACCA ACCCTTGGCA GAACATATCC ATCGCGTCCG 2400

CCATCTCCAG CAGCCGCACG CGGCGCATCT CGGGCAGCGT TGGGTCCTGG CCACGGGTGC 2460

GCATGATCGT GCTCCTGTCTG TTGAGGACCC GGCTAGGCTG GCGGGGTTGC CTTACTGGTT 2520

AGCAGAATGA ATCACCGATA CGCGAGCGAA CGTGAAGCGA CTGCTGCTGC AAAACGTCTG 2580

CGACCTGAGC AACAACATGA ATGGTCTTCG GTTTCCGTGT TTCGTAAAGT CTGGAAACGC 2640

GGAAGTCAGC GCCCTGCACC ATTATGTTCC GGATCTGCAT CGCAGGATGC TGCTGGCTAC 2700

CCTGTGGAAC ACCTACATCT GTATTAACGA AGCGCTGGCA TTGACCCTGA GTGATTTTTC 2760

TCTGGTCCCG CCGCATCCAT ACCGCCAGTT GTTTACCCTC ACAACGTTCC AGTAACCGGG 2820

CATGTTTCATC ATCAGTAACC CGTATCGTGA GCATCCTCTC TCGTTTCATC GGTATCATT 2880

CCCCCATGAA CAGAAATTCC CCCTTACACG GAGGCATCAA GTGACCAAAC AGGAAAAAAC 2940

CGCCCTTAAC ATGGCCCGCT TTATCAGAAG CCAGACATTA ACGCTTCTGG AGAAACTCAA 3000

CGAGCTGGAC GCGGATGAAC AGGCAGACAT CTGTGAATCG CTTACGACC ACGCTGATGA 3060

GCTTTACCGC AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA 3120

GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA 3180

GGGCGCGTCA GCGGGTGTG GCGGGTGTG GGGCGCAGCC ATGACCCAGT CACGTAGCGA 3240

TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCC GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGCAC 3300

CATATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCGCTCT 3360

TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCGTTT GGCTGCGGCG AGCGGTATCA 3420

GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC 3480

ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT 3540

TTCCATAGGC TCCGCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG 3600

CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC 3660

TCTCCTGTTT CGACCCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC 3720

GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CCGTGTAAGT CGTTCGCTCC 3780

AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC 3840

TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT 3900

AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT 3960

AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC 4020

TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA CCACCGCTGG TAGCGGTGGT 4080

TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGGCG AGAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG 4140

ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAAC CACGTTAAGG GATTTTGGTC 4200

ATGAGATTAT CAAAAGGAT CTTCACCTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTAAAA 4260

TCAATCTAAA GTATATATGA GTAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG 4320

GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTTCTG TCATCCATAG TTGCCTGACT CCCCCTCGTG 4380

TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGCGA 4440

GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG 4500

CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA 4560

GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTGCAGGC 4620

ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC CCAACGATCA 4680

AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG 4740

ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT 4800

AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGA CTGGTGA GTACTCAACC 4860

AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCCGGC GTCAACACGG 4920

GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGAAA ACGTTCTTCG 4980

GGGCGAAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT 5040

GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA 5100

GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA 5160

CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC 5220

ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTC CGCGCACATT TCCCCGAAAA 5280

GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCATGACAT TAACCTATAA AAATAGGCGT 5340

ATCAGGAGGC CCTTTCGTCT TCAAGAATTA ATTGTTATCC GCTCACAATT AATTCTTGAC 5400

AATTAGTTAA CTATTTGTGA TAATGTATTC ATAAGCTT 5438

配列番号 : 26

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCTGCCGAAC AGAAGTCTAA

20

配列番号 : 27~

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CTCGAAGGAA CAATGGATAC

20

配列番号 : 28

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GTACATATTG TCGTTAGAAC GCG

23

配列番号 : 29

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TAATACGACT CACTATACGG AGA

23

配列番号 : 30

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCGGATCCTG ATGTCTATTT CATCTTCT

28

配列番号 : 31

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ATCTCGAGTT TTATGCTGCT GCGCCAGCGA

30

特許請求の範囲

1. 配列番号1のポリペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸配列を含むポリペプチドAからなる、クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチド。
2. ポリペプチドAが、配列番号1のポリペプチドからアミノ酸が欠落しているポリペプチドである、請求項1記載の抗原ポリペプチド。
3. ポリペプチドAが、配列番号1のポリペプチドの中のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されているか、又は配列番号1のポリペプチドの中にアミノ酸が挿入されているポリペプチドである、請求項1記載の抗原ポリペプチド。
4. ポリペプチドAが、配列番号1のポリペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸配列にアミノ酸若しくはペプチドが結合したポリペプチドである、請求項1記載の抗原ポリペプチド。
5. ポリペプチドAが配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項1記載の抗原ポリペプチド。
6. ポリペプチドAが配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項1記載の抗原ポリペプチド。
7. ポリペプチドAが配列番号5のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項1記載の抗原ポリペプチド。
8. 請求項1～7のいずれかに記載の抗原ポリペプチドをコードするDNA若しくはそれに相補的なDNA。
9. 塩基配列が配列番号3の塩基配列である、請求項8記載のDNA。
10. 塩基配列が配列番号4の塩基配列である、請求項8記載のDNA。
11. 塩基配列が配列番号7の塩基配列である、請求項8記載のDNA。
12. 請求項8～11のいずれかに記載のDNAを含む組換えベクター。
13. 組換えベクターが配列番号10の塩基配列を有するpCPN533 α プラスミドである、請求項12記載の組換えベクター。
14. 請求項12又は請求項13記載の組換えベクターを含む形質転換体。
15. 請求項1～7のいずれかに記載の抗原ポリペプチドを抗原として用いることを特徴とする、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の製造方法。

16. 請求項1～7のいずれかに記載の抗原ポリペプチドを抗原として用いることを特徴とする、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定方法。
17. 請求項1～7のいずれかに記載の抗原ポリペプチドを抗原として含有してなる、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定用試薬。
18. 請求項1～7のいずれかに記載の抗原ポリペプチドを有効成分とする、クラミジア・ニューモニエ感染の診断薬。
19. 配列番号14のポリペプチドに、直接に又は介在アミノ酸配列を介して、配列番号1のポリペプチドの中の連続した少なくとも5個のアミノ酸配列を含むポリペプチドBが結合した、ジヒドロ葉酸還元酵素－クラミジア・ニューモニエの抗原ポリペプチド融合タンパク質。
20. ポリペプチドBが、配列番号1のポリペプチドからアミノ酸が欠落しているポリペプチドである、請求項19記載の融合タンパク質。
21. ポリペプチドBが、配列番号1のポリペプチドの中のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されているか、又は配列番号1のポリペプチドの中にアミノ酸が挿入されているポリペプチドである、請求項19記載の融合タンパク質。
22. 融合タンパク質が配列番号15のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項19記載の融合タンパク質。
23. 融合タンパク質が配列番号16のアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項19記載の融合タンパク質。
24. 請求項19～23のいずれかに記載の融合タンパク質をコードするDNA若しくはそれに相補的なDNA。
25. 塩基配列が配列番号17の塩基配列である、請求項24記載のDNA。
26. 塩基配列が配列番号18の塩基配列である、請求項24記載のDNA。
27. 請求項24～26のいずれかに記載のDNAを含む組換えベクター。
28. 組換えベクターがpCPN533Tプラスミドである請求項27記載の組換えベクター。
29. 請求項27又は請求項28記載の組換えベクターを含む形質転換体。
30. 請求項19～23のいずれかに記載の融合タンパク質を抗原として用いることを特徴とする、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の製造方法。

31. 請求項19～23のいずれかに記載の融合タンパク質を抗原として用いることを特徴とする、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定方法。
32. 請求項19～23のいずれかに記載の融合タンパク質を抗原として含有してなる、抗クラミジア・ニューモニエ抗体の検出・測定用試薬。
33. 請求項19～23のいずれかに記載の融合タンパク質を有効成分とする、クラミジア・ニューモニエ感染の診断薬。
34. (a) 配列番号3のDNAの中の連続した少なくとも10塩基の塩基配列を有するDNA、
(b) 上記(a)のDNAに相補的なDNA、又は
(c) 上記(a)若しくは(b)のDNAと90%以上の相同性を有するDNA、
のいずれかを含有するDNAからなる、クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用プローブ。
35. 塩基配列が配列番号19の塩基配列である、請求項34記載のプローブ。
36. 塩基配列が配列番号20の塩基配列である、請求項34記載のプローブ。
37. 請求項34～36のいずれかに記載のプローブを用いる、クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定方法。
38. 請求項34～36のいずれかに記載のプローブを含有してなるクラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用試薬。
39. 請求項34～36のいずれかに記載のプローブを有効成分とする、クラミジア・ニューモニエ感染の診断薬。
40. (a) 配列番号3のDNAの中の連続した少なくとも10塩基の塩基配列を有するDNA、
(b) 上記(a)のDNAに相補的なDNA、又は
(c) 上記(a)若しくは(b)のDNAと90%以上の相同性を有するDNA、
のいずれかを含有するDNAからなる、クラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用プライマー。
41. 塩基配列が配列番号19の塩基配列である、請求項40記載のプライマー。
42. 塩基配列が配列番号20の塩基配列である、請求項40記載のプライマー。
43. 請求項40～42のいずれかに記載のプライマーを用いる、クラミジア・

ニューモニエ遺伝子の検出・測定方法。

44. 請求項40～42のいずれかに記載のプライマーを含有してなるクラミジア・ニューモニエ遺伝子の検出・測定用試薬。

45. 請求項40～42のいずれかに記載のプライマーを有効成分とする、クラミジア・ニューモニエ感染の診断薬。

要約

配列番号 1 のポリペプチドの中の連続した少なくとも 5 個のアミノ酸配列を含むポリペプチド A からなる、クラミジア・ニューモニエ（以下「C. ニューモニエ」という）の抗原ポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該抗原ポリペプチドを抗原として用いることを特徴とする抗 C. ニューモニエ抗体の製造方法、抗 C. ニューモニエ抗体の検出・測定方法及び該抗原ポリペプチドの用途、並びに配列番号 14 のポリペプチドに、配列番号 1 のポリペプチドの中の少なくとも 5 個のアミノ酸配列を含むポリペプチド A が結合した、ジヒドロ葉酸還元酵素－C. ニューモニエの抗原ポリペプチド融合タンパク質、該融合タンパク質をコードする DNA、該 DNA を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該融合タンパク質を抗原として用いることを特徴とする抗 C. ニューモニエ抗体の製造方法、該融合タンパク質を抗原として用いることを特徴とする抗 C. ニューモニエ抗体の検出・測定方法、該融合タンパク質の用途、C. ニューモニエ遺伝子の検出・測定用プローブ及びプライマー、該プローブ又はプライマーを用いる C. ニューモニエ遺伝子の検出・測定方法及び該プローブ又はプライマーの用途。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01896

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07K14/295, C12N15/31, C12N1/21, C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/68, G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07K14/295, C12N15/31, C12N1/21, C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/68, G01N33/569

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIKUTA L. C. et al., "Isolation and Sequence Analysis of the Chlamydia pneumoniae GroE Operon" INFECTION AND IMMUNITY, Dec. 1991, Vol. 59, No. 12, pages 4665-4669	1 - 15, 19 - 30
A	KORNAK J. M. et al., "Sequence Analysis of the Gene Encoding the Chlamydia pneumoniae DnaK Protein Homolog" INFECTION AND IMMUNITY, Feb. 1991, Vol. 59, No. 2, pages 721-725	1 - 14, 19 - 29
A	MELGOSA M. P. et al., "Sequence Analysis of the Major Outer membrane Protein Gene of Chlamydia pneumoniae" INFECTION AND IMMUNITY, Jun. 1991, Vol. 59, No. 6, pages 2195-2199.	1 - 14, 19 - 29
A	JP, 4-297871, A (Hitachi Chemical Co., Ltd.), October 21, 1992 (21. 10. 92) & EP, 456524, A1 & US, 5318892, A	16 - 18, 31 - 33
A	JP, 5-317097, A (Fuso Pharmaceutical Co., Ltd.),	34 - 45

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 8, 1995 (08. 12. 95)

Date of mailing of the international search report

December 26, 1995 (26. 12. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01896**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>December 3, 1993 (03. 12. 93) & EP, 402993, A1 & CA, 2017520, A & FI, 9002990, A & US, 5085986, A & KR, 9209424, B1</p>	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C07K14/295, C12N15/31, C12N1/21,
C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/68,
G01N33/569

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C07K14/295, C12N15/31, C12N1/21,
C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/68,
G01N33/569

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE.WPI.WPI/L.BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KIKUTA L. C. et al. . " Isolation and Sequence Analysis of the Chlamydia pneumoniae GroE Operon" INFECTION AND IMMUNITY, Dec. 1991, Vol. 59, No. 12, pages 4665-4669	1-15, 19-30
A	KORNAK J. M. et al. . " Sequence Analysis of the Gene Encoding the Chlamydia pneumoniae DnaK Protein Homolog" INFECTION AND IMMUNITY, Feb. 1991, Vol. 59, No. 2, pages 721-725	1-14, 19-29

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に賛成を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.12.95

国際調査報告の発送日

26.12.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村明照

4 B 9 2 8 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると思われる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 箇所の範囲の番号
A	MELGOSA M. P. et al. , " Sequence Analysis of the Major Outer Membrane Protein Gene of Chlamydia pneumoniae " INFECTION AND IMMUNITY, Jun. 1991, Vol. 59, No. 6, pages 2195-2199	1-14, 19-29
A	JP, 4-297871, A (日立化成工業株式会社), 21. 10月. 1992 (21. 10. 92) &EP, 456524, A1&US, 5318892, A	16-18, 31-33
A	JP, 5-317097, A (扶桑薬品工業株式会社), 3. 12月. 1993 (03. 12. 93) &EP, 402993, A1&CA, 2017520, A &FI9002990, A&US, 5085986, A &KR, 9209424, B1	34-45